

Requested document: [JP2003164298 click here to view the pdf document](#)

SCREENING METHOD FOR AMYLOID BETA PROTEIN PRODUCTION INHIBITOR

Patent Number:

Publication date: 2003-06-10

Inventor(s): SUZUKI TOSHIJI; ARAKI YOICHI; TOMITA SUSUMU

Applicant(s): TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD; SUZUKI TOSHIJI

Requested Patent: ☐ [JP2003164298](#)

Application Number: JP20010367100 20011130

Priority Number (s): JP20010367100 20011130

IPC Classification: C12N15/09; C12Q1/68; A61K45/00; A61P25/28; A61P43/00; C07K14/47; C07K19/00; C12Q1/02; G01N33/15; G01N33/50

EC Classification:

Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method of screening prophylactic and therapeutic medicines for Alzheimer's disease.

SOLUTION: XB31[alpha] or [beta], X11L and [beta]APP are used to screen the compounds which can inhibit the formation of amyloid [beta] protein.

COPYRIGHT: (C)2003,JPO

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-164298
(P2003-164298A)

(43) 公開日 平成15年6月10日 (2003.6.10)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 25/28		A 6 1 P 25/28	4 B 0 6 3
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1 4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数48 O L (全 41 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-367100(P2001-367100)

(22) 出願日 平成13年11月30日 (2001.11.30)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年8月25日
社団法人日本生化学会発行の「生化学 第73巻 第8
号」に発表

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(74) 上記1名の代理人 100106323

弁理士 関口 陽 (外1名)

(71) 出願人 501170910

鈴木 利治

北海道札幌市北区北8条西7丁目 中央第
一公務員宿舍14-22

(74) 上記1名の代理人 100114041

弁理士 高橋 秀一 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミロイドβタンパク質産生阻害薬のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】アルツハイマー病の予防・治療薬のスクリー
ニング方法の提供。

【解決手段】XB31αまたはβ、X11LおよびβAP
Pを用いることを特徴とするアミロイドβタンパクの産
生を阻害する化合物のスクリーニング方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】XB31 α または β を用いることを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項2】XB31 α または β およびX11Lを用いることを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項3】XB31 α または β とX11Lとの複合体を用いる請求項2記載のスクリーニング方法。

【請求項4】XB31 α または β 、X11Lおよびアミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)を用いることを特徴とするA β の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項5】XB31 α または β とX11Lとアミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)との複合体を用いる請求項4記載のスクリーニング方法。

【請求項6】XB31 α または β 、X11L、アミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)およびXB51を用いることを特徴とするA β の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項7】XB31 α または β とX11Lとアミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)との複合体、およびXB51を用いる請求項6記載のスクリーニング方法。

【請求項8】XB31 α または β 遺伝子を用いることを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項9】XB31 α または β 遺伝子およびX11L遺伝子を用いることを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項10】XB31 α または β 遺伝子、X11L遺伝子およびアミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)遺伝子を用いることを特徴とするA β の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項11】XB31 α または β 遺伝子、X11L遺伝子、アミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)遺伝子およびXB51遺伝子を用いることを特徴とするA β の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項12】XB31 α または β 、X11L、アミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)およびXB51を共発現し得る細胞を用いることを特徴とするA β の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項13】A β の産生量を指標とする請求項1～12記載のスクリーニング方法。

【請求項14】XB31 α または β とX11Lとの解離

を阻害する化合物もしくはXB31 α または β とX11Lとの結合を促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法である請求項1～13記載のスクリーニング方法。

【請求項15】アミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)とX11Lとの解離を阻害する化合物もしくは β APPとX11Lとの結合を促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法である請求項1～13記載のスクリーニング方法。

【請求項16】XB31 α または β およびアミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)と、X11Lとの解離を阻害する化合物、もしくはXB31 α または β および β APPと、X11Lとの結合を促進する化合物、またはその塩のスクリーニング方法である請求項1～13記載のスクリーニング方法。

【請求項17】X11LとXB51との結合を阻害する化合物、もしくはX11LとXB51との解離を促進する化合物、またはその塩のスクリーニング方法である請求項1～13記載のスクリーニング方法。

【請求項18】A β 関連疾患の予防・治療薬のスクリーニング方法である請求項1～17記載のスクリーニング方法。

【請求項19】アルツハイマー病の予防・治療薬のスクリーニング方法である請求項1～17記載のスクリーニング方法。

【請求項20】XB31 α が配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である請求項1～7記載のスクリーニング方法。

【請求項21】XB31 β が配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である請求項1～7記載のスクリーニング方法。

【請求項22】X11Lが配列番号：5で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である請求項2～7記載のスクリーニング方法。

【請求項23】 β APPが配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である請求項4～7記載のスクリーニング方法。

【請求項24】XB51が配列番号：9で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である請求項6または7記載のスクリーニング方法。

【請求項25】XB31 α 遺伝子が配列番号：2で表される塩基配列を含有する遺伝子である請求項8～11記載のスクリーニング方法。

【請求項26】XB31 β 遺伝子が配列番号：4で表される塩基配列を含有する遺伝子である請求項8～11記載のスクリーニング方法。

【請求項27】X11L遺伝子が配列番号：6で表される塩基配列を含有する遺伝子である請求項9～11記載のスクリーニング方法。

【請求項28】 β APP遺伝子が配列番号：8で表される

塩基配列を含有する遺伝子である請求項10または11記載のスクリーニング方法。

【請求項29】XB51遺伝子が配列番号:10で表される塩基配列を含有する遺伝子である請求項11記載のスクリーニング方法。

【請求項30】XB31 α または β 、X11L、アミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)およびXB51を共発現し得る細胞を含有することを特徴とするA β の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項31】請求項1~29のいずれかに記載のスクリーニング方法または請求項30記載のスクリーニング用キットを用いて得られるアミロイド β タンパク質(A β)の産生を阻害する化合物またはその塩。

【請求項32】請求項1~29のいずれかに記載のスクリーニング方法または請求項30記載のスクリーニング用キットを用いて得られるアミロイド β タンパク質(A β)の産生を阻害する化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬。

【請求項33】A β 関連疾患の予防・治療剤である請求項32記載の医薬。

【請求項34】アルツハイマー病の予防・治療剤である請求項32記載の医薬。

【請求項35】哺乳動物に対して、請求項1~29のいずれかに記載のスクリーニング方法または請求項30記載のスクリーニング用キットを用いて得られるアミロイド β タンパク質(A β)の産生を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするA β の産生阻害方法。

【請求項36】A β 関連疾患の予防・治療方法である請求項35記載の方法。

【請求項37】アルツハイマー病の予防・治療方法である請求項35記載の方法。

【請求項38】XB31 α または β とX11Lとの解離を阻害するか、またはXB31 α または β とX11Lとの結合を促進することを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)の産生阻害方法。

【請求項39】XB31 α または β およびアミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)と、X11Lとの解離を阻害するか、またはXB31 α または β および β APPと、X11Lとの結合を促進することを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)の産生阻害方法。

【請求項40】A β 関連疾患の予防・治療方法である請求項38または39記載の方法。

【請求項41】アルツハイマー病の予防・治療方法である請求項38または39記載の方法。

【請求項42】アミロイド β タンパク質(A β)の産生を阻害する化合物またはその塩をスクリーニングするためのXB31 α または β の使用。

【請求項43】XB31 α または β を含有することを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)の産生阻害剤。

【請求項44】XB31 α または β 遺伝子を含有することを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)の産生阻害剤。

【請求項45】A β 関連疾患の予防・治療剤である請求項43または44記載の剤。

【請求項46】アルツハイマー病の予防・治療剤である請求項43または44記載の剤。

【請求項47】XB31 α または β とX11Lとの複合体またはその塩。

【請求項48】XB31 α または β とX11Lとアミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)との複合体またはその塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アミロイド β タンパク(A β)の産生を阻害する化合物をスクリーニングする方法に関する。

【0002】

【従来の技術】アルツハイマー病患者脳の病理学的特徴として、神経細胞の脱落に加えて、老人斑、神経原線維変化の蓄積が知られている。これらのうち、アルツハイマー病における最初期の病理変化は老人斑の形成であり、その主要構成成分がA β であることから、A β の産生あるいは分解の異常がアルツハイマー病の発症・進展に深く関わっていると考えられている。A β は前駆体タンパク質(β APP)から β -セクレターゼと γ -セクレターゼにより切断され産生される。 β -セクレターゼについては、既に新規アスパラギン酸プロテアーゼであることが同定された(Neuron 27, 419-422, 2000)。一方、 γ -セクレターゼについては、家族性アルツハイマー病(FAD)原因遺伝子、プレセニリンあるいはプレセニリンを含む複合体がその活性発現に関与していることが明らかにされている(Neuron 27, 419-422, 2000)。また、最近、プレセニリンと複合体を形成し、 β APPのプロセシングに関与する新規膜貫通型糖蛋白質としてニカストリン(Nicastrin)が報告された(Nature 407, 48-54, 2000)。XB31 α 遺伝子は、鈴木利治らのグループによって単離されたが(荒木陽一、富田進、鈴木利治[2001]第74回日本生化学会大会10月25-28日京都; Genbank/EBI Data Bank: AF438482)、その機能は明らかにされていない。XB31 β 遺伝子は、かずさDNA研究所の小原収らのグループによって単離されたが(Nucleic Acids Res, 28, 331-332, 2000; HUGE cDNA clone KIAA0726)、その機能は明らかにされていない。XB31 α およびXB31 β は、一回膜貫通型の膜タンパク質であり、アミノ末端側の細胞外ドメインには、2つのカドヘリン様モチーフと1つのCa²⁺結合サイトを有する。

約100アミノ酸からなる細胞内ドメインは、X11L結合サイトと酸性アミノ酸に富む領域を有する。XB31 α 遺伝子は、スプライシングの違いにより2種類のタンパク質XB31 α 1とXB31 α 2を発現する。XB31 α 1は、XB31 α 2のアミノ末端側の10アミノ酸をコードする1つのエクソンを欠失している以外のアミノ酸配列はXB31 α 2と完全に一致する。XB31 α とXB31 β は、アミノ酸レベルで約55%の相同性を示す。X11LはPIDドメインとPDZドメインを有しており、PIDドメインを介して β APPと複合体を形成し、この複合体が解離することによりA β の産生が増加することが報告されている(The Journal of Biological Chemistry, 274, No.4, 2243-2254, 1999, The Journal of Biological Chemistry, 275, No.17, 13056-13060, 2000)。XB51はX11Lと結合することにより、X11Lと β APPとの複合体が解離し、A β の産生が増加することが報告されている(The Journal of Biological Chemistry, 275, No.30, 23134-23138, 2000)。しかしながら、XB31 α または β がX11Lおよび β APPと複合体を形成すること、X11LとXB31 α または β および β APPとの解離により、A β の産生が増加することは全く知られていなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】このようにA β の産生に関する詳細なメカニズムが明らかにされていなかったために、A β の産生を阻害し、アルツハイマー病を効果的に予防・治療する化合物のスクリーニング方法は報告されていなかった。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、(1)XB31 α または β がX11Lおよび β APPと複合体を形成すること、(2)X11LがXB31 α または β および β APPと解離することにより、A β の産生が増加することを始めて見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明は、(1)XB31 α または β を用いることを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(2)XB31 α または β およびX11Lを用いることを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(3)XB31 α または β とX11Lとの複合体を用いる上記(2)記載のスクリーニング方法、(4)XB31 α または β 、X11Lおよびアミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)を用いることを特徴とするA β の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(5)XB31 α または β とX11Lとアミロイド β タンパク質(A β)

の前駆体タンパク質(β APP)との複合体を用いる上記(4)記載のスクリーニング方法、(6)XB31 α または β 、X11L、アミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)およびXB51を用いることを特徴とするA β の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(7)XB31 α または β とX11Lとアミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)との複合体、およびXB51を用いる上記(6)記載のスクリーニング方法、(8)XB31 α または β 遺伝子を用いることを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(9)XB31 α または β 遺伝子およびX11L遺伝子を用いることを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(10)XB31 α または β 遺伝子、X11L遺伝子およびアミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)遺伝子を用いることを特徴とするA β の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(11)XB31 α または β 遺伝子、X11L遺伝子、アミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)遺伝子およびXB51遺伝子を用いることを特徴とするA β の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(12)XB31 α または β 、X11L、アミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)およびXB51を共発現し得る細胞を用いることを特徴とするA β の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(13)A β の産生量を指標とする上記(1)～(12)記載のスクリーニング方法、(14)XB31 α または β とX11Lとの解離を阻害する化合物もしくはXB31 α または β とX11Lとの結合を促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法である上記(1)～(13)記載のスクリーニング方法、(15)アミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)とX11Lとの解離を阻害する化合物もしくは β APPとX11Lとの結合を促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法である上記(1)～(13)記載のスクリーニング方法、(16)XB31 α または β およびアミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)と、X11Lとの解離を阻害する化合物、もしくはXB31 α または β および β APPと、X11Lとの結合を促進する化合物、またはその塩のスクリーニング方法である上記(1)～(13)記載のスクリーニング方法、(17)X11LとXB51との結合を阻害する化合物、もしくはX11LとXB51との解離を促進する化合物、またはその塩のスクリーニング方法である上記(1)～(13)記載のスクリーニング方法、(18)A β 関連疾患の予防・治療薬のスクリーニング方法である上記(1)～(17)記載のスクリーニング方法、(19)アルツハイマー病の予防・治療薬

のスクリーニング方法である上記(1)～(17)記載のスクリーニング方法、(20)XB31 α が配列番号:1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である上記(1)～(7)記載のスクリーニング方法、(21)XB31 β が配列番号:3で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である上記(1)～(7)記載のスクリーニング方法、(22)X11Lが配列番号:5で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である上記(2)～(7)記載のスクリーニング方法、(23) β APPが配列番号:7で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である上記(4)～(7)記載のスクリーニング方法、(24)XB51が配列番号:9で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である上記(6)または(7)記載のスクリーニング方法、(25)XB31 α 遺伝子が配列番号:2で表される塩基配列を含有する遺伝子である上記(8)～(11)記載のスクリーニング方法、(26)XB31 β 遺伝子が配列番号:4で表される塩基配列を含有する遺伝子である上記(8)～(11)記載のスクリーニング方法、(27)X11L遺伝子が配列番号:6で表される塩基配列を含有する遺伝子である上記(9)～(11)記載のスクリーニング方法、(28) β APP遺伝子が配列番号:8で表される塩基配列を含有する遺伝子である上記(10)または(11)記載のスクリーニング方法、(29)XB51遺伝子が配列番号:10で表される塩基配列を含有する遺伝子である上記(11)記載のスクリーニング方法、(30)XB31 α または β 、X11L、アミロイド β タンパク質($A\beta$)の前駆体タンパク質(β APP)およびXB51を共発現し得る細胞を含有することを特徴とする $A\beta$ の産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(31)上記(1)～(29)のいずれかに記載のスクリーニング方法または上記(30)記載のスクリーニング用キットを用いて得られるアミロイド β タンパク質($A\beta$)の産生を阻害する化合物またはその塩、(32)上記(1)～(29)のいずれかに記載のスクリーニング方法または上記(30)記載のスクリーニング用キットを用いて得られるアミロイド β タンパク質($A\beta$)の産生を阻害する化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、(33) $A\beta$ 関連疾患の予防・治療剤である上記(32)記載の医薬、(34)アルツハイマー病の予防・治療剤である上記(32)記載の医薬、(35)哺乳動物に対して、上記(1)～(29)のいずれかに記載のスクリーニング方法または上記(30)記載のスクリーニング用キットを用いて得られるアミロイド β タンパク質($A\beta$)の産生を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする $A\beta$ の産生阻害方法、(36) $A\beta$ 関連疾患の予防・治療方法である上記(35)記載の方法、(37)アルツハイマー病の予防・治

療方法である上記(35)記載の方法、(38)XB31 α または β とX11Lとの解離を阻害するか、またはXB31 α または β とX11Lとの結合を促進することを特徴とするアミロイド β タンパク質($A\beta$)の産生阻害方法、(39)XB31 α または β およびアミロイド β タンパク質($A\beta$)の前駆体タンパク質(β APP)と、X11Lとの解離を阻害するか、またはXB31 α または β および β APPと、X11Lとの結合を促進することを特徴とするアミロイド β タンパク質($A\beta$)の産生阻害方法、(40) $A\beta$ 関連疾患の予防・治療方法である上記(38)または(39)記載の方法、(41)アルツハイマー病の予防・治療方法である上記(38)または(39)記載の方法、(42)アミロイド β タンパク質($A\beta$)の産生を阻害する化合物またはその塩をスクリーニングするためのXB31 α または β の使用、(43)XB31 α または β を含有することを特徴とするアミロイド β タンパク質($A\beta$)の産生阻害剤、(44)XB31 α または β 遺伝子を含有することを特徴とするアミロイド β タンパク質($A\beta$)の産生阻害剤、(45) $A\beta$ 関連疾患の予防・治療剤である上記(43)または(44)記載の剤、(46)アルツハイマー病の予防・治療剤である上記(43)または(44)記載の剤、(47)XB31 α または β とX11Lとの複合体またはその塩、および(48)XB31 α または β とX11Lとアミロイド β タンパク質($A\beta$)の前駆体タンパク質(β APP)との複合体またはその塩を提供する。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明で用いられるXB31 α は、配列番号:1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質(以下、XB31 α と略記する)である。本発明で用いられるXB31 β は、配列番号:3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質(以下、XB31 β と略記する)である。本発明で用いられるX11Lは、配列番号:5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質(以下、X11Lと略記する)である。本発明で用いられる β APPは、配列番号:7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質(以下、 β APPと略記する)である。本発明で用いられるXB51は、配列番号:9で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質(以下、XB51と略記する)である。XB31 α 、XB31 β 、X11L、 β APPまたはXB51(以下、本発明で用いられるタンパク質と略記する場合がある)は、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓 β 細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ラ

ンゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

【0007】配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、各配列番号で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。各配列番号で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、各配列番号で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、各配列番号で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

【0008】実質的に同質の活性としては、XB31 α または β の場合はX11LのPDDメインとの結合活性などが、X11Lの場合はXB31 α または β または β APPとの結合活性などが、 β APPの場合はX11LのPDDメインとの結合活性などが、XB51の場合はX11Lとの結合活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理的に）同質であることを示す。したがって、上記の活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

【0009】また、本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、①各配列番号で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②各配列番号で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し

たアミノ酸配列、③各配列番号で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④各配列番号で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、活性が消失しない限り、特に限定されない。具体的には、XB31 α には、（1）配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するXB31 α 1と、（2）配列番号：1で表されるアミノ酸配列の第71番目と72番目に10アミノ酸が挿入されたXB31 α 2が存在する。

【0010】本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するXB31 α をはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基、ビバロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイルなどのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質な

どの複合タンパク質なども含まれる。

【0011】本発明で用いられるタンパク質の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0012】本発明で用いられるタンパク質またはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、それらタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製分離することができる。

【0013】本発明で用いられるタンパク質またはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOObt）とともに保護ア

ミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0014】保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

【0015】原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、C1-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラシルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C₁₋₆）アルカノイル基、ベンズイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭

酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bz、 Cl_2 -Bz、2-ニトロベンジル、Br-Z、*t*-ブチルなどが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホン、DNP、ベンジルオキシメチル、Bom、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0016】原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、*N*-ヒドロキスクシミド、*N*-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0017】原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチドとを製造し、これらのペ

チドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

【0018】本発明で用いられるタンパク質またはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って製造することができる。タンパク質の合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられるタンパク質を構成し得るペプチドまたはアミノ酸残基と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のタンパク質を製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①~⑥に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publisher s, New York (1966年)

②SchroederおよびLuecke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験 丸善 (株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV 205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられるタンパク質を精製分離することができる。上記方法で得られるタンパク質が遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0019】本発明で用いられるタンパク質をコードする遺伝子は、各タンパク質をコードする塩基配列 (DNAまたはRNA、好ましくはDNA) を含有するものであればいかなるものであってもよい。該遺伝子としては、本発明で用いられるタンパク質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでも

よい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。本発明で用いられるタンパク質をコードする遺伝子としては、前述した本発明で用いられるタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。本発明で用いられるXB31 α をコードする遺伝子としては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列を含有する遺伝子、または配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するXB31 α と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子であれば何れのものでもよい。本発明で用いられるXB31 β をコードする遺伝子としては、例えば、配列番号：4で表される塩基配列を含有する遺伝子、または配列番号：4で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するXB31 β と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子であれば何れのものでもよい。

【0020】本発明で用いられるX11Lをコードする遺伝子としては、例えば、配列番号：6で表される塩基配列を含有する遺伝子、または配列番号：6で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：5で表されるアミノ酸配列を含有するX11Lと実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子であれば何れのものでもよい。本発明で用いられる β APPをコードする遺伝子としては、例えば、配列番号：8で表される塩基配列を含有する遺伝子、または配列番号：8で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有する β APPと実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子であれば何れのものでもよい。本発明で用いられるXB51をコードする遺伝子としては、例えば、配列番号：10で表される塩基配列を含有する遺伝子、または配列番号：10で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：9で表されるアミノ酸配列を含有するXB

51と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子であれば何れのものでもよい。

【0021】各配列番号で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、各配列番号で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するXB31 α をコードする遺伝子としては、配列番号：2で表される塩基配列を含有する遺伝子などが用いられる。配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するXB31 β をコードする遺伝子DNAとしては、配列番号：4で表される塩基配列を含有する遺伝子などが用いられる。配列番号：5で表されるアミノ酸配列を含有するX11Lをコードする遺伝子としては、配列番号：6で表される塩基配列を含有する遺伝子などが用いられる。配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有する β APPをコードする遺伝子としては、配列番号：8で表される塩基配列を含有する遺伝子などが用いられる。配列番号：9で表されるアミノ酸配列を含有するXB51をコードする遺伝子DNAとしては、配列番号：19で表される塩基配列を含有する遺伝子などが用いられる。

【0022】本発明で用いられるタンパク質を完全にコードする遺伝子のクローニングの手段としては、本発明で用いられるタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明で用いられるタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場

合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。遺伝子の塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-superExpress Km (宝酒造(株))、MutanTM-K (宝酒造(株))等を用いて、ODA-LAPCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。クローン化されたタンパク質をコードする遺伝子は目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該遺伝子はその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。本発明で用いられるタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明で用いられるタンパク質をコードする遺伝子から目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該遺伝子断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0023】ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、入フェージなどのバクテリオフェージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0024】発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以

下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子〔メソトレキセート(MTX)耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明で用いられるタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明で用いられるタンパク質をコードする遺伝子を含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0025】宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli) K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)〕, JM103〔ヌクレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)〕, JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)〕, HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)〕, C600〔ジェネティクス(Genetics), 39巻, 440(1954)〕などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチリス(Bacillus subtilis) MI114〔ジーン, 24巻, 255(1983)〕, 207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)〕などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シゾサッカロマイセス ポンベ(Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036, ピキア パストリス(Pichia pastoris) KM71などが

用いられる。

【0026】昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがA c NPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell ; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmene acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N細胞 ; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592 (1985)〕。動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT-20, マウスミエロマ細胞、ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972)やジーン (Gene), 17巻, 107 (1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0027】バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111 (1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456 (1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

【0028】このようにして、タンパク質をコードする遺伝子を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物そ

の他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0029】エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 (Bostian, K. L.ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980))や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984))が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0030】宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962))に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association), 195, 103-164298 (P2003-164298A)]が挙げられる。

1 Association) 199巻, 519(1967)], 199 9 培地 [「プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73 巻, 1(1950)]」などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明で用いられるタンパク質を生成せしめることができる。

【0031】上記培養物から本発明で用いられるタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。本発明で用いられるタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0032】かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニンエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成する本発明で用いられるタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより測定することができる。

【0033】[Aβの産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法] 本発明のスクリーニング方法は、(1) XB31αまたはβを用いることを特徴とするAβの産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(2) XB31αまたはβおよびX11L(好ましくは、XB31αまたはβとX11Lとの複合体)を用いることを特徴とするAβの産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(3) XB31αまたはβ、X11LおよびβAPP(好ましくは、XB31αまたはβとX11LとβAPPとの複合体)を用いることを特徴とするAβの産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(4) XB31αまたはβ、X11L、βAPPおよびXB51(好ましくは、XB31αまたはβとX11LとβAPPとの複合体、およびXB51)を用いることを特徴とするAβの産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(5) XB31αまたはβ遺伝子を用いることを特徴とするAβの産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(6) XB31αまたはβ遺伝子およびX11L遺伝子を用いることを特徴とするAβの産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(7) XB31αまたはβ遺伝子、X11L遺伝子およびβAPP遺伝子を用いることを特徴とするAβの産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(8) XB31αまたはβ遺伝子、X11L遺伝子、βAPP遺伝子およびXB51遺伝子を用いることを特徴とするAβの産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(9) XB31αまたはβ、X11L、βAPPおよびXB51を共発現し得る細胞を用いることを特徴とするAβの産生を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法である。

【0034】本発明のスクリーニング方法は、例えば、Aβの産生量を指標とすることができる。Aβとしては、配列番号: 13で表されるアミノ酸配列からなるAβ40、配列番号: 14で表されるアミノ酸配列からなるAβ42、配列番号: 15で表されるアミノ酸配列からなるAβ43などが挙げられる。より具体的には、上記のスクリーニング方法において、試験化合物の存在下または非存在下におけるAβの産生量を測定し、比較する。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、遺伝子(ゲノムDNA、cDNA)などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。Aβの測定法には種々の方法が用いられるが、Aβ特異的抗体を用いる免疫化学的方法を用いることが好ましい。これらの方法には、免疫沈降法、ウエスタンブロッティング、酵素免疫測定法、サンドイッチ型酵素免疫測定法あるいはそれらの組み合わせ方法が用いられる。Aβ特異的抗体としては、ポリクローナル抗体を用いても良い

が、例えば、BAN50、BNT77、BS85、BA27、BC05 (Biochemistry, 34, 10272-10278, 1995) または6E10、4G8などのモノクローナル抗体を用いても良い。とりわけ、BA27およびBC05は、それぞれA β 40およびA β 42/43に選択的な抗体であるため、これらの抗体、あるいは同様な選択性を有する抗体を用いれば、A β 40の産生を阻害する化合物、A β 42/43の産生を阻害する化合物、あるいはA β 40およびA β 42/43いずれの産生も阻害する化合物を選択することが可能となる。さらに、分泌型 β APP量はA β の産生を間接的に反映すると考えられることから、分泌型 β APP量を免疫沈降法、ウェスタンブロッティング、酵素免疫測定法、サンドイッチ型酵素免疫測定法などの免疫化学的方法で検出しても良い。XB31 α または β 、X11L、 β APPおよびXB51を共発現し得る細胞としては、これらの遺伝子を含有するベクターで形質転換した形質転換体を用いることができるが、他にIMR-32、PC12h、Neuro-2a、SK-N-SHなどの細胞株、または β APPとPS-1/2を導入したHEK-293などの細胞株を用いることもできる。本発明のスクリーニング方法(A)においては、例えば、試験化合物の存在下におけるA β 産生量が、試験化合物の非存在下におけるA β 産生量に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上減少している試験化合物をA β の産生を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。また、コントロールとして、XB31 α または β 、X11L、 β APPおよび(または)XB51を発現していない細胞を用いて、試験化合物の存在下におけるA β 産生量を測定することもできる。

【0035】本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるXB31 α または β 、X11L、 β APPおよびXB51、またはそれらをコードする遺伝子、またはそれらを共発現し得る細胞を含有するものである。上記した本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物は、(1)XB31 α または β とX11Lとの解離を阻害するか、XB31 α または β とX11Lとの結合を促進することにより、(2) β APPとX11Lとの解離を阻害するか、 β APPとX11Lとの結合を促進することにより、(3)XB31 α または β および β APPと、X11Lとの解離を阻害するか、化合物、もしくはXB31 α または β および β APPと、X11Lとの結合を促進することにより、(4)X11LとXB51との結合を阻害するか、X11LとXB51との解離を促進することにより、A β (特に、A β 40)の産生を阻害する化合物またはその塩である。

【0036】上記したスクリーニング方法で得られた化合物またはそれから誘導される化合物は、塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸)や塩基(例アルカリ金

属)等との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩等が用いられる。上記した本発明のスクリーニング方法で得られた化合物は、A β の産生を効率良く阻害することができるので、A β 関連疾患(例えば、アルツハイマー病)の予防・治療剤として使用することができる。本発明のスクリーニング方法で得られた化合物を含有する医薬は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤を含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等があげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウム等が用いられる。また、例えば非経口投与に適する剤形としては、注射剤(例、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉注射剤、腹腔内注射剤など)、外用剤(例、経鼻投与剤、経皮投与剤、軟膏剤など)、座剤(例、直腸剤、膣座剤など)、徐放剤(例、徐放性マイクロカプセルなど)、ペレット、点滴剤などが用いられる。

【0037】このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルート等により差異はあるが、例えば、アルツハイマー病の治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.01~1000mg、好ましくは約0.1~1000mg、さらに好ましくは約1.0~200mg、より好ましくは約1.0~50mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、例えば、アルツハイマー病の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するの

が好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0038】本発明で用いられるXB31 α または β を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、哺乳動物（例、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル等）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルート等によっても異なるが、例えば、XB31 α または β を1回量として、通常0.001~20mg/kg体重程度、好ましくは0.01~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。本発明で用いられるXB31 α または β をコードする遺伝子を含有する医薬は、前記のスクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

【0039】〔治療方法〕本発明は、(1)XB31 α または β とX11Lとの解離を阻害するか、またはXB31 α または β とX11Lとの結合を促進することを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)の産生阻害方法、(2)XB31 α または β および β APPと、X11Lとの解離を阻害するか、またはXB31 α または β および β APPと、X11Lとの結合を促進することを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)の産生阻害方法を提供する。この方法は、A β 関連疾患（例えば、アルツハイマー病）の予防・治療方法として有用である。XB31 α または β とX11Lとの解離を阻害するか、またはXB31 α または β とX11Lとの結合を促進する手段としては、前記したスクリーニング方法で得られる、XB31 α または β とX11Lとの解離を阻害するか、またはXB31 α または β とX11Lとの結合を促進する化合物またはその塩を投与することなどが挙げられる。XB31 α または β および β APPと、X11Lとの解離を阻害するか、またはXB31 α または β および β APPと、X11Lとの結合を促進する手段としては、前記したスクリーニング方法で得られる、XB31 α または β および β APPと、X11Lとの解離を阻害するか、またはXB31 α または β および β APPと、X11Lとの結合を促進する化合物またはその塩を投与することなどが挙げられる。

【0040】〔XB31 α またはXB31 β を含有する医薬〕XB31 α または β は、X11Lと β APPと複合体を形成することにより、A β の産生を抑制することができるので、XB31 α または β 、あるいはXB31 α または β をコードする遺伝子は、A β 関連疾患（例えば、アルツハイマー病）の予防・治療剤として有用であ

る。XB31 α またはXB31 β をA β 関連疾患の予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って実施すればよい。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、XB31 α または β を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混合することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアガムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

【0041】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えばポリソルベート80TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに無菌的に充填される。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等）に対して投与することができる。XB31 α またはXB31 β の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルート等により差異はあるが、例えば、アルツハイマー病の治療目的で経口投与する場合、

一般的に成人 (体重 60 kg として) においては、一日につき約 0.01~1000 mg、好ましくは約 0.1~1000 mg、さらに好ましくは約 1.0~200 mg、より好ましくは約 1.0~50 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、XB31 α または XB31 β の 1 回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、例えば、アルツハイマー病の治療目的で注射剤の形で通常成人 (60 kg として) に投与する場合、一日につき約 0.01~30 mg 程度、好ましくは約 0.1~20 mg 程度、より好ましくは約 0.1~10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

【0042】XB31 α または XB31 β をコードする遺伝子を用いる場合、該遺伝子を単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該遺伝子は、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。製剤化は、前記した XB31 α または XB31 β を含有する製剤と同様に行うことができる。該遺伝子の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、アルツハイマー病患者 (60 kg として) においては、一日につき約 0.1 mg~1.00 mg、好ましくは約 1.0~50 mg、より好ましくは約 1.0~20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形で通常例えば、アルツハイマー病患者 (60 kg として) においては、一日につき約 0.01~30 mg 程度、好ましくは約 0.1~20 mg 程度、より好ましくは約 0.1~10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

【0043】〔新規複合体〕XB31 α または β と X11L との複合体、および XB31 α または β と X11L と β APP との複合体またはその塩は新規であり、上記した本発明のスクリーニングに有用である。複合体の塩としては、前記した本発明のスクリーニング方法に用いられるタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

【0044】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Co

Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

mmission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ L 体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

【0045】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリアプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Hse	: ホモセリン

【0046】また、本明細書中で頻用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

Tos	: p-トルエンスルフォニル
CHO	: ホルミル
Bzl	: ベンジル
Cl ₂ -Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
Bom	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
Boc	: t-ブトキシカルボニル
DNP	: ジニトロフェニル
Trt	: トリチル
Bum	: t-ブトキシメチル
Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
HOObt	: 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1,2,3-ベンゾトリアジン
HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

【0047】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕XB31 α のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕XB31 α をコードする遺伝子の塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕XB31 β のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕XB31 β をコードする遺伝子の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕X11Lのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：6〕X11Lをコードする遺伝子の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕 β APPのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：8〕 β APPをコードする遺伝子の塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕XB51のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：10〕XB51をコードする遺伝子の塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕A β 40のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：12〕A β 42のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：13〕A β 43のアミノ酸配列を示す。

【0048】

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いた遺伝子操作は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

【0049】参考例1 XB31 α 1 cDNAおよびXB31 β cDNAのクローニング

クローニングに用いたYeast two-hybridシステムは、富田らの方法 (J. Biol. Chem. 274, 2243-2254, 1999) およびLeeらの方法 (J. Biol. Chem. 275, 23134-23138, 2000) を使用した。pGBT9hX11L-N+PIプラスミド、ヒトX

11様タンパク質 (hX11L) の第129～555アミノ酸残基からなる蛋白質をコードするcDNAをヒト脳MATCHMAKER cDNAライブラリー (CLONTECH) 由来のX11L結合蛋白質をコードするcDNAを単離するためのベイトとして使用した。陽性クローンの塩基配列を解析したところ、単離されたヒトcDNAクローン31は、3'末端にポリAシグナルが付加した1.5kbを含んでいた。得られたクローン31の5'塩基配列 (~200bp) をプローブとして用いて λ gt11ヒト脳cDNAライブラリー (CLONTECH) をスクリーニングし、より5'末端側領域を含むクローンを得た。同様の操作でcDNAスクリーニングを3回繰り返して、新規蛋白質の全長を含む5つの部分cDNAを取得した。ヒトXB31 α 1 (hXB31 α 1) cDNAの全長は、これら5つのクローンを連結することによりpcDNA3に再構築し、pcDNA3-hXB31 α 1を作製した。得られたcDNAは2.9kbpのコーディング領域を含む5.0kbp以上であった。そして、HUGE (A Database of Human Unidentified Gene-Encoded Large Protein Analyzed by Kazusa cDNA Project) Protein Database (Kikunoら、Nucleic Acid Res. 28, 331-322, 2000) で、2種の同様のcDNAが検索できた。そこで、取得できたcDNAをhXB31 α 1 (Genebank/EBI Data Bank: AF438482) と、2種のHUGE cDNAをそれぞれhXB31 α 2 (K1AA0911) およびhXB31 β (K1AA0726) と名づけた (図1)。hXB31 α 2 cDNAは、hXB31 α 1のN末端部分に10アミノ酸が付加した981アミノ酸からなる蛋白質をコードしており、hXB31 α 1 cDNAとhXB31 α 2 cDNAはスプライシング変異体であることが分かった。hXB31 β cDNAは、hXB31 α 1と55%の相同性を有する968アミノ酸からなる蛋白質hXB31 β をコードしていた。XB31 β cDNAクローンはかずさDNA研究所から入手し、pcDNA3にサブクローニングして、発現ベクターpcDNA3-hXB31 β を作製した。また、これらのN末端にFLAG tag (DYKDDDK) を付加したFLAG-hXB31

$\alpha 1$ in pcDNA3および FLAG-hXB31 β in pcDNA3を作製し、以下の実験に用いた。

【0050】参考例2 XB31 $\alpha 1$ とXB31 β のノーザンブロット解析

Human multiple tissue Northern blots (CLONETECH社)を購入し、ExpressHyb Hybridization Solution (CLONETECH社)を用いマニュアルに従ってハイブリダイゼーションを行った。XB31 $\alpha 1$ およびXB31 β のための具体的なプローブは、それぞれXB31 $\alpha 1$ の第871から971番目のアミノ酸をコードするcDNAおよびXB31 β の第881から968番目のアミノ酸をコードするcDNAから作製した。プローブを[α - 32 P]dCTPおよびランダムオリゴヌクレオチド (High prime DNA Labeling Kit; Roch Diagnostics)を用いて、鋳型cDNAを放射線標識した。結果を図2に示したとおり、XB31 $\alpha 1$ およびXB31 β が脳で強く発現していることが分かった。

【0051】参考例3 抗体の産生

ウサギポリクローナル抗体UT-83は、hXB31 $\alpha 1$ C末端18残基 (配列番号: 1で表されるアミノ酸配列の第954番目~971番目)のN末端にCysを付加した19アミノ酸残基からなるペプチド10mgをHemocyanin (SIGMA) 10mgにカップリングしてウサギに免疫 (Primary injection+Booster x2)して得た。得られた抗血清はSulfo-Link Gel (Pierce)で抗原ペプチドをカップリングしたアフィニティークラムで精製した (最終抗体濃度 0.16mg/ml IgG。本願明細書中、希釈率を指定したものは全てこの溶液を希釈して用いている)。ウサギポリクローナル抗体BS-7は、hXB31 β C末端14残基 (配列番号: 3で表されるアミノ酸配列の第954番目~968番目)のN末端にCysを付加した15アミノ酸残基からなるペプチド10mgをHemocyanin (SIGMA) 10mgにカップリングしてウサギに免疫 (Primary injection+Booster x2)して得た。得られた抗血清はSulfo-Link Gel (Pierce)で抗原ペプチドをカップリングしたアフィニティークラムで精製した (最終抗体濃度 0.84mg/ml IgG。本願明細書中、先希釈率を指定したものは全てこの溶液を希釈して用いている)。

【0052】参考例4 XB31 $\alpha 1$ およびXB31 β のウエスタンブロット解析

(1) 抗体の交差性検討

COS7細胞にhXB31 $\alpha 1$ 、hXB31 β in pcDNA3をそれぞれ10 μ g (プラスミドDNA) (6cm dish1枚1x10⁷ cellsあたり)をLipofectAMINE (GIBCO BRL)を用いて、トランスフェクションした。方法はメーカーのInstruction Manualに従った。トランスフェクション48時間後、細胞をPBS (組成: 10mM Sodium Phosphate buffer pH7.4, 150mM NaCl)で2回洗浄した後、100 μ l cell lysis buffer (組成: 0.5% TritonX-100, 0.05% β -Mercaptoethanol, 0.5mM EDTA, 0.5mM EGTA, 1mM NaVO₄, 125mM Sucrose, 25mM Tris-acetate pH8.0), 10 μ l Protease inhibitor M

ix (P.I. mix, 組成: 5mg/ml Leupeptin, PepstatinA, Calyostatin in DMSO)を加え、細胞を可溶化した。氷上で30分インキュベートした後、12000rpm 10min遠心して、上清を取り可溶化成分を回収した。回収した可溶化成分はTCA沈澱法を用いたMicroLowry法により、蛋白定量を行い、可溶化成分を1レーンあたり50 μ g (タンパク質)滴下し、SDS-PAGEを行った後、メンブランに転写したのち、抗hXB31 $\alpha 1$ 抗体 UT-83 (1/1000)、抗hXB31 β 抗体 BS-7 (1/500)を用いてブロットを行った。2次抗体として抗ウサギIgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody (from donkey) (Amersham Pharmacia Biotechnologies社) 1:5000を使用した。検出はECL Detection System (Amersham Pharmacia Biotechnologies社)を用い、メーカーのinstruction manualに従い、操作を行った。結果を図3および図4に示したとおり、抗XB31 $\alpha 1$ 抗体UT-83および抗XB31 β 抗体BS-7は、hXB31 $\alpha 1$ およびhXB31 β をそれぞれ特異的に認識していることが確認された。

(2) 組織可溶化

組織化溶化は、C57BL/6J マウス、8週齢、オスより各部位を採取し、5倍容の組織抽出緩衝液 (1% SDS, 4M Urea, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 20mM Tris pH8.0)を加え、Dounce ホモジナイザーで20ストロークした後、15000xg, 10min, 4°Cで遠心し、可溶化された上清を回収した。この上清をTCA沈澱法を用いたMicroLowry法により蛋白定量し、粗可溶化成分を1レーンあたり50 μ g (タンパク質)滴下し、SDS-PAGEを行った後、メンブランに転写したのち、抗hXB31 $\alpha 1$ 抗体 UT-83 (1/1000)、抗Mint 2抗体 (Transduction Labs, 1/1000)を用いて、ブロットを行った。2次抗体としてUT-83は、抗ウサギ IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody (from donkey) (Amersham Pharmacia Biotechnologies社) 1:5000, anti-Mint2は、抗マウス IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody (from sheep) (Amersham Pharmacia Biotechnologies社) 1:5000を使用した。検出はECL Detection System (Amersham Pharmacia Biotechnologies社)を用い、メーカーのinstruction manualに従い、操作を行った (部位の略号は以下の通りである。Br; 脳, Ht; 心臓, Lu; 肺, Li; 肝臓, Kid; 腎臓, Mus; 筋, Ob; 嗅球, CC; 大脳皮質, ST; 線状体, Hip; 海馬, Ce; 小脳, Mid; 中脳, Th; 視床, Pons; 橋, Sci; 座骨神経)。結果を図5および図6に示した。図5からhXB31 $\alpha 1$ とhX11Lが共に脳で強く発現していることが分かった。また、図6からhXB31 $\alpha 1$ とhX11Lが脳の各種組織、特に大脳皮質、線状体、海馬、視床で強く発現していることが分かった。

【0053】実施例1 XB31 α/β とX11Lの共役免疫沈降

COS7細胞にLipofectAMINE PLUS (GIBCO BRL)を用いて、各3 μ gのhXB31 $\alpha 1$ またはhXB31 β および (または)

hX11L in pcDNA3 の各コンストラクトのプラスミドをトランスフェクションした。総DNA量は6 μ gに統一するため、トランスフェクション(-)の場合には空ベクター-pcDNA3を加えた。トランスフェクション48時間後、P.I mixを含むice-cold PBS (組成: 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4, 150mM NaCl + 5 μ g/ml ロイペプチン, ペプスタチン, ケモスタチン)で細胞を洗浄し、CHAPS Lysis Buffer (10mM CHAPS, 1mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4, 150mM NaCl + 5 μ g/ml ロイペプチン, ペプスタチンA, ケモスタチン)を6cm Dish (3x10⁶細胞相当)につき1ml加えて細胞を可溶化した。可溶化した細胞は、30分間・4℃で穏和に攪拌した後、12000rpm 10min 4℃で遠心し、上清を免疫沈降 (IP) に用いた。IPは可溶化上清1mlに対し、UT-83 10 μ l (1.6 μ g IgG), UT-30 5 μ l (1.9 μ g IgG), BS-7 5 μ l (4 μ g IgG), コントロール用ウサギ非免疫IgG 8 μ l (4 μ g IgG)を加え、4℃で2時間攪拌した。その後、CHAPS Lysis Buffer中の50%ProteinG-Sepharoseを100 μ l加え、さらに4℃で2時間攪拌した。樹脂を遠心により回収しCHAPS Lysis Bufferで3回洗浄した。この樹脂に対し、15 μ l 5x SDS Sample Buffer (43%(v/v)グリセロール(和光純薬(株)), 16%(w/v)SDS(和光純薬(株)), 64ng/ml ブロモフェノールブルー(和光純薬(株)), 5mM EDTA, 0.22M Tris-HCl pH6.8), 15 μ l 8M尿素を加え、攪拌後、5分間煮沸して、樹脂に結合した成分を可溶化した。遠心後、この上清成分を6%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEを行った。SDS-PAGEはLammiの常法に従った。SDS-PAGE後、メンブランに転写し、ウエスタンブロットを行った。ウエスタンブロットは前述の方法で行った。検出に用いた1次抗体濃度は、各々UT-83 1/1000(抗XB31 α 1抗体), BS-7 1/500(抗体XB31 β 抗体), UT-30 1/1000(抗X11L抗体)で行った。結果を図7および図8に示したとおり、hXB31 α 1とhX11Lが細胞内で結合し、それぞれの抗体により共沈殿してくることが分かった。

【0054】実施例2 結合ドメインの決定
XB31 α 1およびXB31 β の細胞質ドメインをGSTと融合させたGST-細胞質ドメイン融合タンパク質またはGST蛋白質のみを結合しているグルタチオンビーズと、hX11L由来の蛋白質構成物を発現しているCOS細胞の全細胞可溶化物とインキュベーションした。ビーズに付着した蛋白質構成物を溶出後X11Lアミノ末端ポリクローナル抗体UT29を用いてウエスタンブロット解析で検出した(図9~10)。図9および図10から、XB31 α 1およびXB31 β はX11LのPIドメイン(図11)と結合することが分かった。

【0055】実施例3 培養神経細胞におけるXB31 α およびX11Lの分布
C57BL/6J マウス胎生16日目胎仔胚より調製した大脳皮質神経細胞を初期培養開始後12日目(DIV12)に、以

下の方法でXB31 α およびX11Lの共蛍光抗体免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。具体的には、poly-L-リジンで被覆したカバーガラス上に生育したDIV12の細胞をP.I. mix (組成は前述)を含むice-cold PBSで洗浄した後、4%(w/v) パラホルムアルデヒド(ナカライ社)、4%(w/v) シュークロース(和光純薬(株))を含むPBS中で室温、10分間インキュベートし細胞を固定した。その後、0.1%(v/v) TritonX-100(Wako社)を含むPBSで室温、5分間インキュベートし、透過処理を行った。その後、PBSで2回洗浄インキュベートし、3%(w/v) BSAを含むPBSで室温10分間インキュベートして、ブロッキングを行った。さらにPBSで2回洗浄したのち、1%(w/v) BSAを含むPBS中の1次抗体溶液(1次抗体溶液 抗Mint2抗体(Transduction Labs 1/100), 抗XB31 α 1抗体(UT-83 1/100))を加え、4℃・3時間インキュベートを行った。インキュベート後、PBSで3回、各5分づつ室温でインキュベートしつつ、洗浄し、1%(w/v) BSAを含むPBS中の2次抗体溶液(抗マウスIgG, Goat, Alexa Flour488 Highly-cross absorbed(Molecular Probes社) 1:100, 抗ウサギIgG, Goat, Alexa Flour568 Highly-cross absorbed(Molecular Probes社) 1:100)を加え、室温1時間incubateを行った。この後、PBSで3回、各10分づつ室温でインキュベートしつつ、洗浄し、Immunmount(SHANDON-RIPSHOW社)でMountを行い、標本を作成した。標本はLSM510(Carl Zeiss社)共焦点レーザー顕微鏡で観察した。各波長で観察した画像は共局在を示すため、Merge画像を作製した(図12)。図12から、XB31 α とX11Lはマウス神経細胞内で共局在する事が分かった。

【0056】実施例4 成体マウス脳組織におけるXB31 α およびX11Lの分布

C57BL/6J 6週令オスマウスを0.2M リン酸緩衝液 pH7.5に溶解した4%(w/v)パラホルムアルデヒド(ナカライテスク電顕グレード)で灌流固定した後、脳を採取した。この脳をさらに0.2M リン酸緩衝液 pH7.5に溶解した4%(w/v) パラホルムアルデヒドで一晩で後固定した後、30%(w/v) シュークロースを含むPBS中に浸した後固定液を置換した。この脳をTissue Tek OCT Compound中に凍結包埋し、クライオスタットを用いて20 μ mの切片を調製した。この切片をPBSでよく洗浄した後、0.1%(v/v) TritonX-100を含むPBS中での5分間室温でインキュベートすることにより、透過処理を行った。PBSで3回洗浄後、0.3%(v/v) H₂O₂を含むPBS中で室温5分間処理し、内在性peroxidaseのQuenchingを行った。さらに3%(w/v) BSAを含むPBS中で室温10分間インキュベートして、ブロッキングを行った。PBSで2回洗浄したのち、1%(w/v) BSAを含むPBSに溶解した1次抗体溶液(抗Mint2抗体(Transduction Labs 1/100), 抗XB31 α 1抗体(UT-83 1/100))を加え、4℃・3時間インキュベートを行った。コントロールとして一次抗体を含まない1%

(w/v)BSAを含むPBSを用いて同様の操作を行った。インキュベート後、PBSで3回、各5分づつ室温で洗浄し、1%(w/v)BSAを含むPBS中の2次抗体溶液〔抗マウスIgG, Goat, Alexa Flour488 Highly-cross absorbed(Molecular Probes社) 1:500, 抗ウサギIgG, Goat, Alexa Flour568 Highly-cross absorbed(Molecular Probes社) 1:500〕を加え、室温1時間インキュベートを行った。この後、PBSで3回、各10分づつ室温で洗浄し、1mmumount (SHANDON-RIPSHOW社)でMountを行い、標本とした。標本はLSM510(Carl Zeiss社)共焦点レーザー顕微鏡で観察した。各波長で観察した画像は共局在を示すため、Merge画像を作製した(図13)。図13において、(a-d)は海馬、(e-h)は大脳皮質、(i-l)は小脳の染色像を示す。海馬においてX11LとXB31 α は、CA3領域のピラミダルニューロン等で共局在した。大脳皮質においては、第5層の神経でX11LとXB31 α は、強く発現しており共局在していた。小脳においては、プルキンエ細胞はX11Lを発現していないが、XB31 α は発現していた。これらのことから、X11LとXB31 α の両方を発現している神経細胞では、両タンパク質は共局在していることが明らかになった。

【0057】実施例5 APPとX11L間の結合性に対するXB31 α / β の効果

図14に示したような組み合わせ(+は発現ベクターでトランスフェクションを行ったものを示し、-は空ベクターpcDNA3でトランスフェクションしたものを示す)で293細胞に各3 μ g(Total 9 μ g/6cm dish 1枚あたり)のプラスミドDNAをLipofectAMINE2000(GIBCO BRL)を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後、実施例1と同様にして293細胞を可溶化し、共役免疫沈降(IP)を行った。IPに用いた抗体量はCHAPS Lysate 1mlに対し、G369 血清4 μ l, 22C11 (1mg/ml IgG) 20 μ lを用いた。G369は β APPの細胞質ドメインに対するポリクローナル抗体を、22C11は β APPの細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体を示す。結果を図14に示した。図14から、XB31 α およびXB31 β は β APPとX11Lとの結合を強化することが明らかになった。

【0058】実施例6 β APPのパルス・チェイス解析 293細胞に対し、LipofectAMINE2000(GIBCO BRL)を用い10cm Dish 1枚あたり以下のDNA用量と組み合わせでTransfectionを行った。

- A. APP(4 μ g)
- B. APP(4 μ g), X11L(0.5 μ g)
- C. APP(4 μ g), X11L(0.5 μ g), FLAG XB31 α 1 (13.5 μ g)
- D. APP (4 μ g), FLAG XB31 α 1 (13.5 μ g)

総DNA量を等しくするために計18 μ gとなるように、空のpcDNA3を加えた。トランスフェクション後48時間経過した293細胞をメチオニンを含まないDMEM(DMEM(-); GIBCO BRL社)で2回洗浄して、 ϕ 6cm dish(Total 1.0 \times 10⁷ cells)にまき直し、新鮮なDMEM(-)3.5mlを培地としている2

93細胞に、最終濃度0.4mCi/mlとなるように102 μ lのL-[³⁵S] in vitro cell labeling mix (Pharmacia Biotech AGQ0080)を加え、37 $^{\circ}$ C・5%CO₂インキュベータで15分インキュベートし、生成タンパク質をラベルした。その後、100 μ lの100xメチオニン(GIBCO BRL社)を加え、アイソトープの取り込みを停止させ、通常培地(10%FCS添加DMEM)に培地を交換し、37 $^{\circ}$ C・5%CO₂インキュベータに移し、インキュベートを開始した。細胞は0, 1, 2, 4, 8時間後にインキュベータより取り出した。その後、293cellをPBS(組成: 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.4, 150mM NaCl)で2回洗浄した後、100 μ l細胞抽出用緩衝液(組成: 0.5%TritonX-100, 0.05% β -メルカプトエタノール, 0.5mM EDTA, 0.5mM EGTA, 1mM NaVO₄, 125mM シュークロース, 25mM Tris-acetate pH8.0), 10 μ l プロテアーゼ阻害剤混合液(組成: 5 μ g/ml ロイペプチン, ペプスタチンA, ケモスタチン in DMSO)を加え、細胞を可溶化した。氷上で30分インキュベートした後、12000rpm 10min遠心して、上清を取り可溶化成分を回収した。回収した細胞可溶化成分は抗体G369(Antigen: APP細胞質ドメイン)を用い、培地は22C11(APP細胞外ドメイン/ CHEMICON社)を用いてそれぞれ免疫沈降を行った。具体的には、細胞可溶化緩衝液中の細胞可溶化成分100 μ lに対し、100 μ l Mix Φ (2.2% SDS, 5.44M 尿素, 100mM Tris-HCl pH7.4)を加え、5分間煮沸し、タンパク成分を変性させた。その後750 μ l Mix Φ (6.7% NP-40, 0.4M NaCl, 26mMEDTA, 200mM Tris-HCl pH7.4), 350 μ l Mix Φ (10ng/ml ロイペプチン, ペプスタチン, ケモスタチン in DDW)を順次加えた後、G369抗体4 μ lを加え、4 $^{\circ}$ C 0/Nで 攪拌して抗原抗体反応を進行させた。そののち、リンス液(0.1%TritonX-100, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.4)に懸濁した25%ProteinG-sepharose/25% Sepharose-CL4B(Pharmacia Biotech)を50 μ l 加え、4 $^{\circ}$ C 3時間、攪拌した。樹脂成分を3000rpm・5分間・4 $^{\circ}$ C遠心して沈澱、これを回収した。回収した樹脂は非特異的結合を除く目的で、洗浄液I (0.1% TritonX-100, 1M NaCl, 20mM Tris-HCl pH7.4)、洗浄液II (0.05%SDS, 1%TritonX-100, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH7.4)、リンス液(組成は前述)で、順次洗浄した。その後、樹脂に15 μ l 5x SDS Sample Buffer (43%グリセロール(和光純薬(株)), 16%SDS(和光純薬(株)), 64ng/ml ブロモフェノールブルー(和光純薬(株)), 5mM EDTA, 0.22M Tris-HCl pH 6.8), 15 μ l 8M 尿素を加え、攪拌後、5分間煮沸して、樹脂についている成分を可溶化した。遠心後、この上清成分を6%ポリアクリルアミドゲルを用い、SDS-PAGEを行った。SDS-PAGEはLammiの常法に従った。SDS-PAGE後、ゲルを乾燥し、BAS2000 imaging system(FUJI)によりタンパク質に取り込まれた放射活性を定量した(図15)。定量結果は時間0のimAPPのシグナル強度を1として相対強度でグラフ上にプロットした(図16)。

図15および図16に示すとおり、 β APPとX11Lを共発現させると、 β APPの代謝安定化が見られた。さらにXB31 α 1を発現させると、XB31 α 1は β APPの代謝を劇的に安定化した。また、XB31 α 1の単独発現では β APP代謝に影響が見られなかったことから、XB31 α 1はX11Lを介して β APPの代謝を安定化する方向に制御していることが分かった。これは図13で示したXB31 α 1が β APPとX11Lの結合を強化する結果と一致する。

【0059】実施例7 サンドイッチELISA(sELISA)によるA β の定量

293細胞に対し、LipofectAMINE2000(GIBCO BRL)を用い6cm Dish 1枚あたり以下のDNA用量と組み合わせでトランスフェクションを行った。

- A. APP(3 μ g)
- B. APP(3 μ g), X11L(0.3 μ g)
- C. APP(3 μ g), X11L(0.3 μ g), FLAG XB31 α 1 (5.7 μ g)
- D. APP (3 μ g), FLAG XB31 α 1 (5.7 μ g)

総DNA量を等しくするために計9 μ gとなるように、空のp cDNA3を加えた。トランスフェクション48時間後、培地

を回収し、J.Biol.Chem. 274 2243-2254, 1999に記載の方法によりsELISAを行い、培地中のA β x-40 (図17), A β x-42 (図18)の値を定量した。図17から明らかとなり、 β APPにX11Lを共発現させるとA β 40の抑制効果が認められた。ここにさらにXB31 α 1を発現させるとA β 40産生をさらに抑制した。XB31 α 1の単独発現ではA β 産生に影響が見られなかったことから、XB31 α 1はX11Lを介して β APP代謝を安定化し、結果としてA β 産生を低下させていると考えられる。以上の実験結果から、図18に示すとおり、XB31 α 1または β が β APPおよびX11Lと複合体を形成することにより、A β (特に、A β 40)の産生を抑制していることが分かった。

【0060】

【発明の効果】本発明のスクリーニング方法を用いることにより、効率良くアルツハイマー病の予防・治療薬をスクリーニングすることができる。

【0061】

【配列表】

[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> A Method For Screening An Inhibitor of Producing Amyloid β protein

<130> B01447

<160> 13

<210> 1

<211> 971

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

```

Met Leu Arg Arg Pro Ala Pro Ala Leu Ala Pro Ala Ala Arg Leu Leu
          5              10              15
Leu Ala Gly Leu Leu Cys Gly Gly Gly Val Trp Ala Ala Arg Val Asn
          20              25              30
Lys His Lys Pro Trp Leu Glu Pro Thr Tyr His Gly Ile Val Thr Glu
          35              40              45
Asn Asp Asn Thr Val Leu Leu Asp Pro Pro Leu Ile Ala Leu Asp Lys
          50              55              60
Asp Ala Pro Leu Arg Phe Ala Gly Glu Ile Cys Gly Phe Lys Ile His
          65              70              75              80
Gly Gln Asn Val Pro Phe Asp Ala Val Val Asp Lys Ser Thr Gly
          85              90              95
Glu Gly Val Ile Arg Ser Lys Glu Lys Leu Asp Cys Glu Leu Gln Lys
          100             105             110
Asp Tyr Ser Phe Thr Ile Gln Ala Tyr Asp Cys Gly Lys Gly Pro Asp
          115             120             125
Gly Thr Asn Val Lys Lys Ser His Lys Ala Thr Val His Ile Gln Val
          130             135             140
Asn Asp Val Asn Glu Tyr Ala Pro Val Phe Lys Glu Lys Ser Tyr Lys
          145             150             155             160

```

Ala Thr Val Ile Glu Gly Lys Gln Tyr Asp Ser Ile Leu Arg Val Glu
 165 170 175
 Ala Val Asp Ala Asp Cys Ser Pro Gln Phe Ser Gln Ile Cys Ser Tyr
 180 185 190
 Glu Ile Ile Thr Pro Asp Val Pro Phe Thr Val Asp Lys Asp Gly Tyr
 195 200 205
 Ile Lys Asn Thr Glu Lys Leu Asn Tyr Gly Lys Glu His Gln Tyr Lys
 210 215 220
 Leu Thr Val Thr Ala Tyr Asp Cys Gly Lys Lys Arg Ala Thr Glu Asp
 225 230 235 240
 Val Leu Val Lys Ile Ser Ile Lys Pro Thr Cys Thr Pro Gly Trp Gln
 245 250 255
 Gly Trp Asn Asn Arg Ile Glu Tyr Glu Pro Gly Thr Gly Ala Leu Ala
 260 265 270
 Val Phe Pro Asn Ile His Leu Glu Thr Cys Asp Glu Pro Val Ala Ser
 275 280 285
 Val Gln Ala Thr Val Glu Leu Glu Thr Ser His Ile Gly Lys Gly Cys
 290 295 300
 Asp Arg Asp Thr Tyr Ser Glu Lys Ser Leu His Arg Leu Cys Gly Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Gly Thr Ala Glu Leu Leu Pro Ser Pro Ser Gly Ser Leu Asn
 325 330 335
 Trp Thr Met Gly Leu Pro Thr Asp Asn Gly His Asp Ser Asp Gln Val
 340 345 350
 Phe Glu Phe Asn Gly Thr Gln Ala Val Arg Ile Pro Asp Gly Val Val
 355 360 365
 Ser Val Ser Pro Lys Glu Pro Phe Thr Ile Ser Val Trp Met Arg His
 370 375 380
 Gly Pro Phe Gly Arg Lys Lys Glu Thr Ile Leu Cys Ser Ser Asp Lys
 385 390 395 400
 Thr Asp Met Asn Arg His His Tyr Ser Leu Tyr Val His Gly Cys Arg
 405 410 415
 Leu Ile Phe Leu Phe Arg Gln Asp Pro Ser Glu Glu Lys Lys Tyr Arg
 420 425 430
 Pro Ala Glu Phe His Trp Lys Leu Asn Gln Val Cys Asp Glu Glu Trp
 435 440 445
 His His Tyr Val Leu Asn Val Glu Phe Pro Ser Val Thr Leu Tyr Val
 450 455 460
 Asp Gly Thr Ser His Glu Pro Phe Ser Val Thr Glu Asp Tyr Pro Leu
 465 470 475 480
 His Pro Ser Lys Ile Glu Thr Gln Leu Val Val Gly Ala Cys Trp Gln
 485 490 495
 Glu Phe Ser Gly Val Glu Asn Asp Asn Glu Thr Glu Pro Val Thr Val
 500 505 510
 Ala Ser Ala Gly Gly Asp Leu His Met Thr Gln Phe Phe Arg Gly Asn
 515 520 525
 Leu Ala Gly Leu Thr Leu Arg Ser Gly Lys Leu Ala Asp Lys Lys Val
 530 535 540
 Ile Asp Cys Leu Tyr Thr Cys Lys Glu Gly Leu Asp Leu Gln Val Leu
 545 550 555 560

Glu Asp Ser Gly Arg Gly Val Gln Ile Gln Ala His Pro Ser Gln Leu
 565 570 575
 Val Leu Thr Leu Glu Gly Glu Asp Leu Gly Glu Leu Asp Lys Ala Met
 580 585 590
 Gln His Ile Ser Tyr Leu Asn Ser Arg Gln Phe Pro Thr Pro Gly Ile
 595 600 605
 Arg Arg Leu Lys Ile Thr Ser Thr Ile Lys Cys Phe Asn Glu Ala Thr
 610 615 620
 Cys Ile Ser Val Pro Pro Val Asp Gly Tyr Val Met Val Leu Gln Pro
 625 630 635 640
 Glu Glu Pro Lys Ile Ser Leu Ser Gly Val His His Phe Ala Arg Ala
 645 650 655
 Ala Ser Glu Phe Glu Ser Ser Glu Gly Val Phe Leu Phe Pro Glu Leu
 660 665 670
 Arg Ile Ile Ser Thr Ile Thr Arg Glu Val Glu Pro Glu Gly Asp Gly
 675 680 685
 Ala Glu Asp Pro Thr Val Gln Glu Ser Leu Val Ser Glu Glu Ile Val
 690 695 700
 His Asp Leu Asp Thr Cys Glu Val Thr Val Glu Gly Glu Glu Leu Asn
 705 710 715 720
 His Glu Gln Glu Ser Leu Glu Val Asp Met Ala Arg Leu Gln Gln Lys
 725 730 735
 Gly Ile Glu Val Ser Ser Ser Glu Leu Gly Met Thr Phe Thr Gly Val
 740 745 750
 Asp Thr Met Ala Ser Tyr Glu Glu Val Leu His Leu Leu Arg Tyr Arg
 755 760 765
 Asn Trp His Ala Arg Ser Leu Leu Asp Arg Lys Phe Lys Leu Ile Cys
 770 775 780
 Ser Glu Leu Asn Gly Arg Tyr Ile Ser Asn Glu Phe Lys Val Glu Val
 785 790 795 800
 Asn Val Ile His Thr Ala Asn Pro Met Glu His Ala Asn His Met Ala
 805 810 815
 Ala Gln Pro Gln Phe Val His Pro Glu His Arg Ser Phe Val Asp Leu
 820 825 830
 Ser Gly His Asn Leu Ala Asn Pro His Pro Phe Ala Val Val Pro Ser
 835 840 845
 Thr Ala Thr Val Val Ile Val Val Cys Val Ser Phe Leu Val Phe Met
 850 855 860
 Ile Ile Leu Gly Val Phe Arg Ile Arg Ala Ala Ser Thr Arg Thr Met
 865 870 875 880
 Arg Asp Gln Asp Thr Gly Lys Glu Asn Glu Met Asp Trp Asp Asp Ser
 885 890 895
 Ala Leu Thr Ile Thr Val Asn Pro Met Glu Thr Tyr Glu Asp Gln His
 900 905 910
 Ser Ser Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ser Glu Asp
 915 920 925
 Gly Glu Glu Glu Asp Asp Ile Thr Ser Ala Glu Ser Glu Ser Ser Glu
 930 935 940
 Glu Glu Glu Gly Glu Gln Gly Asp Pro Gln Asn Ala Thr Arg Gln Gln
 945 950 955 960

Gln Leu Glu Trp Asp Asp Ser Thr Leu Ser Tyr

965

970

<210> 2

<211> 2913

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

```

atgtctgcgc gcccgctcc cgcgtggcc ccggccgccc ggctgtgtgt gccgggctg 60
ctgtgcgcgc gcggggtctg ggccgcgcga gttacaagc acaagccctg gctggagccc 120
acctaccacg ccatagtcac agagaacgac aacaccgtgc tcctcgacc ccactgac 180
gcgttgata aagatgcgc tctgcgattt gcagtgaga tttgtggatt taaaattcac 240
gggcagaatg tcccccttga tgcagtggta gtggataaat ccactgtga gggagtcatt 300
cgctccaaag agaaactgga ctgtgagctg cagaaagact attcattcac catccagccc 360
tatgattgtg ggaaggacc tgatggcacc aacgtgaaa agtctcataa agcaactgtt 420
catattcagg tgaacgacgt gaatgagtag gcgcccgtgt tcaaggagaa gtcctacaaa 480
gccacgtca tcgaggggaa gcagtacgac agcattttga ggtggaggc cgtggatgcc 540
gactgctccc ctcagttcag ccagatttgc agctacgaaa tcactactcc agacgtgccc 600
ttlactgttg acaaatgagg ttatataaaa aacacagaga aattaaacta cgggaagaaa 660
catcaatata agctgaccgt cactgcctat gactgtggga agaaaagagc cacagaagat 720
gttttggtga agatcagcat taagcccacc tgcacccctg ggtggcaagg atggaacaac 780
aggattgagt atgagccggg caccggcgcg ttggccgtct ttccaaatat ccacctggag 840
acatgtgacg agccagtcgc ctcagtacag gccacagtgg agctagaaac cagccacata 900
gggaaaggct gcgaccgaga cacctactca gagaagtccc tcacccgct ctgtggtgcg 960
gccgagggca ctgccgagct gctgccatcc ccgagtggat cctcaactg gaccatgggc 1020
ctgccaccgc acaatggcca cgacagcgac caggtgtttg agttcaacgg caccaggca 1080
gtgaggatcc cggatggcgt cgtgtcggtc agcccaaaag agccgttcac catctcggtg 1140
tggatgagac atgggccatt cggcaggaaag aaggagacaa ttctttgcag ttctgataaa 1200
acagatatga atcgccacca ctactccctc tatgtccacg ggtgccggt gatcttctc 1260
ttccgtcagg atccttctga ggagaagaaa tacagacctg cagagttcca ctggaagttg 1320
aatcaggtct gtgatgagga atggcaccac tacgtctcca atgtagaatt cccgagtgtg 1380
actctctatg tggatggcac gtcccacgag ccttctctg tgactgagga ttacccgctc 1440
catccatcca agatagaaac tcagctcgtg gtggggcctt gctggcaaga gttttcagga 1500
gttgaatg acaatgaaac tgagcctgtg actgtggcct ctgcaggtgg cgacctgcac 1560
atgaccaggt ttttcgagg caatctggt ggcttaactc tcgtttccg gaaactcgcg 1620
gataagaagg tgatcactg tctgtatacc tgcaaggagg ggtggacct gcaggtctc 1680
gaagacagtg gcagaggcgt gcagatcaa gcacaccca gccagttggt attgacctg 1740
gagggagaag acctcgggga attggataag gccatgcagc acatctcgta cctgaactcc 1800
cggcagttcc ccacgcccgg aattcgaga ctcaaatca ccagcacaat caagtgttt 1860
aacgaggcca cctgcattc ggtcccccg gtagatggct acgtgatggt ttacagccc 1920
gaggagccca agatcagcct gaggggcgtc caccattttg cccgagcagc ttctgaattt 1980
gaaagctcag aagggtgtt cttttccct gagcttcga tcacagcac catcacgaga 2040
gaagtggagc ctgaaggga cggggtgag gacccacag ttcaagaatc actggtgtcc 2100
gaggagatcg tgcacgacct ggatacctgt gagtcacgg tggagggaga ggagctgaac 2160
cacgagcagg agagcctgga ggtggacatg gccgcctgc agcagaaggg cattgaagt 2220
agcagctctg aactggcat gaccttaca ggcgtggaca ccattggcag ctacgaggag 2280
gttttgacc tctgcgcta tcggaactg catgccaggt ccttgcttga ccggaagttt 2340
aagctcatct gctcagagct gaatggcgc tacatcagca acgaatttaa ggtggaagt 2400
aatgttatcc acagggcaa ccccatggaa cagccaacc acatggtgc ccagccacag 2460
ttcgtgcacc cggaacaccg ctctttgtt gacctgtcag gccacaacct ggccaacccc 2520
caccgcttcg cagtcgtccc cagcaactgc acagttgtga tcgtggtgtg cgtcagcttc 2580

```

ctggtgttca tgattatcct ggggtatatt cggatccggg ccgctcgac gcggaccatg 2640
 cgggatcagg acaccgggaa ggagaacgag atggactggg acgactctgc cctgaccatc 2700
 accgtcaacc ccatggagac ctatgaggac cagcacagca gtgaggagga ggaggaagag 2760
 gaagaggaag aggaaagcga ggacggcgaa gaagaggatg acatcaccag cggcgagtcg 2820
 gagagcagcg aggaggagga gggggagcag ggcgaccccc agaacgcaac ccggcagcag 2880
 cagctggagt gggatgactc caccctcagc tac 2913

<210> 3

<211> 968

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Met Val Leu Gly Cys Glu Leu Ser Gly Ser Thr Arg Val Val Val Gly
 1 5 10 15
 Val Glu Ala Leu Leu Thr Gly Ala Ser Ser Pro Leu Pro Gly Val Gly
 20 25 30
 Pro Ala Asn Lys His Lys Pro Trp Ile Glu Ala Glu Tyr Gln Gly Ile
 35 40 45
 Val Met Glu Asn Asp Asn Thr Val Leu Leu Asn Pro Pro Leu Phe Ala
 50 55 60
 Leu Asp Lys Asp Ala Pro Leu Arg Tyr Ala Gly Glu Ile Cys Gly Phe
 65 70 75 80
 Arg Leu His Gly Ser Gly Val Pro Phe Glu Ala Val Ile Leu Asp Lys
 85 90 95
 Ala Thr Gly Glu Gly Leu Ile Arg Ala Lys Glu Pro Val Asp Cys Glu
 100 105 110
 Ala Gln Lys Glu His Thr Phe Thr Ile Gln Ala Tyr Asp Cys Gly Glu
 115 120 125
 Gly Pro Asp Gly Ala Asn Thr Lys Lys Ser His Lys Ala Thr Val His
 130 135 140
 Val Arg Val Asn Asp Val Asn Glu Phe Ala Pro Val Phe Val Glu Arg
 145 150 155 160
 Leu Tyr Arg Ala Ala Val Thr Glu Gly Lys Leu Tyr Asp Arg Ile Leu
 165 170 175
 Arg Val Glu Ala Ile Asp Gly Asp Cys Ser Pro Gln Tyr Ser Gln Ile
 180 185 190
 Cys Tyr Tyr Glu Ile Leu Thr Pro Asn Thr Pro Phe Leu Ile Asp Asn
 195 200 205
 Asp Gly Asn Ile Glu Asn Thr Glu Lys Leu Gln Tyr Ser Gly Glu Arg
 210 215 220
 Leu Tyr Lys Phe Thr Val Thr Ala Tyr Asp Cys Gly Lys Lys Arg Ala
 225 230 235 240
 Ala Asp Asp Ala Glu Val Glu Ile Gln Val Lys Pro Thr Cys Lys Pro
 245 250 255
 Ser Trp Gln Gly Trp Asn Lys Arg Ile Glu Tyr Ala Pro Gly Ala Gly
 260 265 270
 Ser Leu Ala Leu Phe Pro Gly Ile Arg Leu Glu Thr Cys Asp Glu Pro
 275 280 285
 Leu Trp Asn Ile Gln Ala Thr Ile Glu Leu Gln Thr Ser His Val Ala
 290 295 300
 Lys Gly Cys Asp Arg Asp Asn Tyr Ser Glu Arg Ala Leu Arg Lys Leu

305 310 315 320
 Cys Gly Ala Ala Thr Gly Glu Val Asp Leu Leu Pro Met Pro Gly Pro
 325 330 335
 Asn Ala Asn Trp Thr Ala Gly Leu Ser Val His Tyr Ser Gln Asp Ser
 340 345 350
 Ser Leu Ile Tyr Trp Phe Asn Gly Thr Gln Ala Val Gln Val Pro Leu
 355 360 365
 Gly Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Pro Gln Asp Ser Leu Ser Asp
 370 375 380
 His Phe Thr Leu Ser Phe Trp Met Lys His Gly Val Thr Pro Asn Lys
 385 390 395 400
 Gly Lys Lys Glu Glu Glu Thr Ile Val Cys Asn Thr Val Gln Asn Glu
 405 410 415
 Asp Gly Phe Ser His Tyr Ser Leu Thr Val His Gly Cys Arg Ile Ala
 420 425 430
 Phe Leu Tyr Trp Pro Leu Leu Glu Ser Ala Arg Pro Val Lys Phe Leu
 435 440 445
 Trp Lys Leu Glu Gln Val Cys Asp Asp Glu Trp His His Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Asn Leu Glu Phe Pro Thr Val Thr Leu Tyr Thr Asp Gly Ile Ser Phe
 465 470 475 480
 Asp Pro Ala Leu Ile His Asp Asn Gly Leu Ile His Pro Pro Arg Arg
 485 490 495
 Glu Pro Ala Leu Met Ile Gly Ala Cys Trp Thr Glu Glu Lys Asn Lys
 500 505 510
 Glu Lys Glu Lys Gly Asp Asn Ser Thr Asp Thr Thr Gln Gly Asp Pro
 515 520 525
 Leu Ser Ile His His Tyr Phe His Gly Tyr Leu Ala Gly Phe Ser Val
 530 535 540
 Arg Ser Gly Arg Leu Glu Ser Arg Glu Val Ile Glu Cys Leu Tyr Ala
 545 550 555 560
 Cys Arg Glu Gly Leu Asp Tyr Arg Asp Phe Glu Ser Leu Gly Lys Gly
 565 570 575
 Met Lys Val His Val Asn Pro Ser Gln Ser Leu Leu Thr Leu Glu Gly
 580 585 590
 Asp Asp Val Glu Thr Phe Asn His Ala Leu Gln His Val Ala Tyr Met
 595 600 605
 Asn Thr Leu Arg Phe Ala Thr Pro Gly Val Arg Pro Leu Arg Leu Thr
 610 615 620
 Thr Ala Val Lys Cys Phe Ser Glu Glu Ser Cys Val Ser Ile Pro Glu
 625 630 635 640
 Val Glu Gly Tyr Val Val Val Leu Gln Pro Asp Ala Pro Gln Ile Leu
 645 650 655
 Leu Ser Gly Thr Ala His Phe Ala Arg Pro Ala Val Asp Phe Glu Gly
 660 665 670
 Thr Asn Gly Val Pro Leu Phe Pro Asp Leu Gln Ile Thr Cys Ser Ile
 675 680 685
 Ser His Gln Val Glu Ala Lys Lys Asp Glu Ser Trp Gln Gly Thr Val
 690 695 700
 Thr Asp Thr Arg Met Ser Asp Glu Ile Val His Asn Leu Asp Gly Cys

705 710 715 720
 Glu Ile Ser Leu Val Gly Asp Asp Leu Asp Pro Glu Arg Glu Ser Leu
 725 730 735
 Leu Leu Asp Thr Thr Ser Leu Gln Gln Arg Gly Leu Glu Leu Thr Asn
 740 745 750
 Thr Ser Ala Tyr Leu Thr Ile Ala Gly Val Glu Ser Ile Thr Val Tyr
 755 760 765
 Glu Glu Ile Leu Arg Gln Ala Arg Tyr Arg Leu Arg His Gly Ala Ala
 770 775 780
 Leu Tyr Thr Arg Lys Phe Arg Leu Ser Cys Ser Glu Met Asn Gly Arg
 785 790 795 800
 Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Ile Val Glu Val Asn Val Leu His Ser Met
 805 810 815
 Asn Arg Val Ala His Pro Ser His Val Leu Ser Ser Gln Gln Phe Leu
 820 825 830
 His Arg Gly His Gln Pro Pro Pro Glu Met Ala Gly His Ser Leu Ala
 835 840 845
 Ser Ser His Arg Asn Ser Met Ile Pro Ser Ala Ala Thr Leu Ile Ile
 850 855 860
 Val Val Cys Val Gly Phe Leu Val Leu Met Val Val Leu Gly Leu Val
 865 870 875 880
 Arg Ile His Ser Leu His Arg Arg Val Ser Gly Ala Gly Gly Pro Pro
 885 890 895
 Gly Ala Ser Ser Asp Pro Lys Asp Pro Asp Leu Phe Trp Asp Asp Ser
 900 905 910
 Ala Leu Thr Ile Ile Val Asn Pro Met Glu Ser Tyr Gln Asn Arg Gln
 915 920 925
 Ser Cys Val Thr Gly Ala Val Gly Gly Gln Gln Glu Asp Glu Asp Ser
 930 935 940
 Ser Asp Ser Glu Val Ala Asp Ser Pro Ser Ser Asp Glu Arg Arg Ile
 945 950 955 960
 Ile Glu Thr Pro Pro His Arg Tyr
 965

<210> 4

<211> 2904

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

atggtgctgg ggtgtgagtt gtctgggtca acaagggttg ttgtgggagt agaggccctg 60
 ctcacagtg cttcctctcc tctccctggg gtggggccag ccaacaagca caagccatgg 120
 attgagcag agtaccaggg catcgtcatg gagaatgaca acacggctct actgaatcca 180
 ccactctttg ccttgacaa ggaatgcccc ctgcgctatg caggtgagat ctgcggcttc 240
 cggtccatg ggtctgggt gccctttgag gctgtgatcc ttgacaaggc gacaggagag 300
 gggtgatcc gggccaagga gcctgtggac tgcgaggccc agaaggaaca caccttcacc 360
 atccaggcct atgactgtgg cgaggcccc gacggggcca acaccaagaa gtccacaag 420
 gccactgtgc atgtcggtg caacgatgtg aacgagtttg cccagtggt tgtggaacgg 480
 ctgtatcgtg cggctgtgac agaggggaag ctgtacgac gcacccctcg ggtggaagcc 540
 attgacgtg actgtcccc ccagtacagc cagatctgct actatgagat tctcacaccc 600
 aacacccctt tctcattga caatgacggg aacattgaga acacagagaa gctgcagtac 660
 agtggtgaga ggcctataa gtttacagt acagcttatg actgtgggaa gaagcgggca 720

gcagatgatg ctgaggtgga gattcaggtg aagccacct gtaaacccag ctggcaaggc 780
 tggaacaaaa ggatcgaata tgcaccaggt gctgggagct tgctttgtt ccttggtatc 840
 cgcttgaga cctgtgatga accactctgg aacattcagg ccaccataga gctgcagacc 900
 agccatgtgg ccaagggtg tgaccgtgac aactactcag agcgggcgct gcggaactc 960
 tgtgtgtctg ccactgggga ggtggatctg ttgcccatgc ctggcccaa tgccaactgg 1020
 acagcaggac tctcggtgca ctacagccag gacagcagcc tgatctactg gttcaatggc 1080
 acccaggctg tgcaggtgcc cctgggtggc cccagtgggc tgggtctctg gcccaggac 1140
 agcctcagtg accacttcac cctgtccttc tggatgaagc atggcgtaac tcccaacaag 1200
 ggcaagaagg aagaggaaac catcgtatgt aacactgtcc agaatagga cggttctct 1260
 cactactcgc tgactgtcca cggtgtagg attgccttcc tctactggcc cctgcttgag 1320
 agtgcgcccc cagtcaagtt cctctggaag ctggagcagg tctgtgatga tgagtggcac 1380
 cactacgctc tgaacctga gttccccaca gtcacactct ataccgacgg catctccttc 1440
 gacctgccc tcaccatga caatggcctc atccaccac ccgaaggga gcctgctctc 1500
 atgattgggg cctgctggac tgaggagaag aacaaagaga aggaagagg agacaacagt 1560
 acagacacca ccaaggaga cctttgtcg atccaccact attccatgg ctaccctggt 1620
 ggtttcagcg tgcctcagg tcgctggag agccgcgagg tcacgagtg cctctatgca 1680
 tgcgggagg ggctggacta tagggatttc gagagcctgg gcaaaggcat gaaggtccac 1740
 gtgaacctt cacagtcct gtcaccctg gaggggatg atgtggagac cttcaacat 1800
 gccctgcagc atgtgctta catgaacact ctgcgtttg ccacgccgg cgtcaggccc 1860
 ctgcgctca ccactgtgt caagtcttc agcgaagagt cctgcgtctc catccctgaa 1920
 gtggagggt acgtgtctg cttcagcct gacgcccc agatctctct gattggcact 1980
 gctcattttg ccccccagc tgtggacttt gaggaacca acggcgtccc tttgttccct 2040
 gatcttcaaa tcacctgtc cattctcac caggtggagg ccaaaaagga tgagattgg 2100
 cagggcacag tgacagacac acgcatgtc gatgagattg tgcacaacct gtaggtgtgt 2160
 gaaatttctc tgggtgggga tgacctggat cccgagcggg aaagcctgct cctggacaca 2220
 acctctctc agcagcgggg gctggagctc accaacacat ctgcctacct cactattgct 2280
 ggggtggaga gcatcactgt gtatgaagag atcctgagc aggtctgtta tcggtgcga 2340
 cacggagctg cctctacac caggaaagtt cggtttctc gctcgaaat gaatggcgt 2400
 tactccagca atgaattcat cgtggagtc aatgtctgc acagcatgaa ccgggttgc 2460
 caccacagcc acgtgtcag ctcccagcag ttcctgcacc gtgtcacca gccccgct 2520
 gagatggctg gacacagcct agccagctcc cacagaaact ccatgatacc cagcggcca 2580
 accctcatca ttgtgtgtg cgtggcttc ctgtgtctca tggctgtct gggcctgtg 2640
 cgcattcatt ccttcaccg ccgcttca gggcgccgg ggctccagg ggctccagt 2700
 gacccaagg acccagacct cttctggat gactcagctc tcaccatcat tgtgaacccc 2760
 atggagtct accagaatcg gcagtcctgt gtgacgggg ctgttgggg ccagcaggag 2820
 gatgaggaca gcagtgtc ggagtggtg gattccccca gcagcgacga gagacgcatc 2880
 atcgagaccc cccacaccg ctac 2904

<210> 5

<211> 749

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Met Ala His Arg Lys Leu Glu Ser Val Gly Ser Gly Met Leu Asp His

5

10

15

Arg Val Arg Pro Gly Pro Val Pro His Ser Gln Glu Pro Glu Ser Glu

20

25

30

Asp Met Glu Leu Pro Leu Glu Gly Tyr Val Pro Glu Gly Leu Glu Leu

35

40

45

Ala Ala Leu Arg Pro Glu Ser Pro Ala Pro Glu Glu Gln Glu Cys His

50

55

60

Asn His Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Ser Asp Tyr Val Asn Asn Thr
 65 70 75 80
 Ser Glu Glu Glu Asp Tyr Asp Glu Gly Leu Pro Glu Glu Glu Glu Gly
 85 90 95
 Ile Thr Tyr Tyr Ile Arg Tyr Cys Pro Glu Asp Asp Ser Tyr Leu Glu
 100 105 110
 Gly Met Asp Cys Asn Gly Glu Glu Tyr Leu Ala His Ser Ala His Pro
 115 120 125
 Val Asp Thr Asp Glu Cys His Glu Ala Val Glu Glu Trp Thr Asp Ser
 130 135 140
 Ala Gly Pro His Pro His Gly His Glu Ala Glu Gly Ser Gln Asp Tyr
 145 150 155 160
 Pro Asp Gly Gln Leu Pro Ile Pro Glu Asp Glu Pro Ser Val Leu Glu
 165 170 175
 Ala His Asp Gln Glu Glu Asp Gly His Tyr Cys Ala Ser Lys Glu Gly
 180 185 190
 Tyr Gln Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Ala Asn Gly Asn Thr Gly Ala Ser
 195 200 205
 Pro Tyr Arg Leu Arg Arg Gly Asp Gly Asp Leu Glu Asp Gln Glu Glu
 210 215 220
 Asp Ile Asp Gln Ile Val Ala Glu Ile Lys Met Ser Leu Ser Met Thr
 225 230 235 240
 Ser Ile Thr Ser Ala Ser Glu Ala Ser Pro Glu His Gly Pro Glu Pro
 245 250 255
 Gly Pro Glu Asp Ser Val Glu Ala Cys Pro Pro Ile Lys Ala Ser Cys
 260 265 270
 Ser Pro Ser Arg His Glu Ala Arg Pro Lys Ser Leu Asn Leu Leu Pro
 275 280 285
 Glu Ala Lys His Pro Gly Asp Pro Gln Arg Gly Phe Lys Pro Lys Thr
 290 295 300
 Arg Thr Pro Glu Glu Arg Leu Lys Trp Pro His Glu Gln Val Cys Asn
 305 310 315 320
 Gly Leu Glu Gln Pro Arg Lys Gln Gln Arg Ser Asp Leu Asn Gly Pro
 325 330 335
 Val Asp Asn Asn Asn Ile Pro Lys Thr Lys Lys Val Ala Ser Phe Pro
 340 345 350
 Ser Leu Val Ala Val Pro Gly Pro Cys Glu Pro Lys Asn Leu Ile Asp
 355 360 365
 Gly Ile Ile Phe Ala Ala Asn Tyr Leu Gly Ser Thr Gln Leu Leu Ser
 370 375 380
 Glu Arg Asn Pro Ser Lys Asn Ile Arg Met Met Gln Ala Gln Glu Ala
 385 390 395 400
 Val Ser Arg Val Lys Arg Met Gln Lys Ala Ala Lys Ile Lys Lys Lys
 405 410 415
 Ala Asn Ser Glu Gly Asp Ala Gln Thr Leu Thr Glu Val Asp Leu Phe
 420 425 430
 Ile Ser Thr Gln Arg Ile Lys Val Leu Asn Ala Asp Thr Gln Glu Thr
 435 440 445
 Met Met Asp His Ala Leu Arg Thr Ile Ser Tyr Ile Ala Asp Ile Gly
 450 455 460

Asn Ile Val Val Leu Met Ala Arg Arg Arg Met Pro Arg Ser Ala Ser
 465 470 475 480
 Gln Asp Cys Ile Glu Thr Thr Pro Gly Ala Gln Glu Gly Lys Lys Gln
 485 490 495
 Tyr Lys Met Ile Cys His Val Phe Glu Ser Glu Asp Ala Gln Leu Ile
 500 505 510
 Ala Gln Ser Ile Gly Gln Ala Phe Ser Val Ala Tyr Gln Glu Phe Leu
 515 520 525
 Arg Ala Asn Gly Ile Asn Pro Glu Asp Leu Ser Gln Lys Glu Tyr Ser
 530 535 540
 Asp Ile Ile Asn Thr Gln Glu Met Tyr Asn Asp Asp Leu Ile His Phe
 545 550 555 560
 Ser Asn Ser Glu Asn Cys Lys Glu Leu Gln Leu Glu Lys His Lys Gly
 565 570 575
 Glu Ile Leu Gly Val Val Val Val Glu Ser Gly Trp Gly Ser Ile Leu
 580 585 590
 Pro Thr Val Ile Leu Ala Asn Met Met Asn Gly Gly Pro Ala Ala Arg
 595 600 605
 Ser Gly Lys Leu Ser Ile Gly Asp Gln Ile Met Ser Ile Asn Gly Thr
 610 615 620
 Ser Leu Val Gly Leu Pro Leu Ala Thr Cys Gln Gly Ile Ile Lys Gly
 625 630 635 640
 Leu Lys Asn Gln Thr Gln Val Lys Leu Asn Ile Val Ser Cys Pro Pro
 645 650 655
 Val Thr Thr Val Leu Ile Lys Arg Pro Asp Leu Lys Tyr Gln Leu Gly
 660 665 670
 Phe Ser Val Gln Asn Gly Ile Ile Cys Ser Leu Met Arg Gly Gly Ile
 675 680 685
 Ala Glu Arg Gly Gly Val Arg Val Gly His Arg Ile Ile Glu Ile Asn
 690 695 700
 Gly Gln Ser Val Val Ala Thr Ala His Glu Lys Ile Val Gln Ala Leu
 705 710 715 720
 Ser Asn Ser Val Gly Glu Ile His Met Lys Thr Met Pro Ala Ala Met
 725 730 735
 Phe Arg Leu Leu Thr Gly Gln Glu Thr Pro Leu Tyr Ile
 740 745

<210> 6

<211> 2247

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

atggcccacc ggaagcttga gagcgtgggg agcggcatgt tggaccatag ggtgagacca 60
 ggtcctgtcc ctcacagcca ggagcccag agcaggaca tggagctgcc cttggagggc 120
 tatgtgcccg agggccttga gctggtgcc ctgcggccag agagccccgc gccaggagaa 180
 caggagtgcc acaaccacag ccccgatggg gactccagct ctgactacgt gaacaacacc 240
 tctgaggagg aggactatga cgagggcctc cctgaggagg aggagggcat cacctactac 300
 atccgtact gcctgagga cgacagctac ctagaggga tggactgcaa cggggaggag 360
 tacctgccc acagtgcaca cctgtggac actgatgaat gccatgagc ggtggaggag 420
 tggacggact cggcgggccc gcacccccc ggccacgagg ctgaaggcag ccaggactac 480
 ccagacggcc aactgccat tccggaggat gagccctccg tccttgaggc ccatgaccag 540

```

gaagaagatg gtcactactg tgccagcaaa gagggetacc aggactacta cccagaggag 600
gccaaaggga acaccggcgc ctccccctac cgctgagge gtggggatgg ggacctggag 660
gaccaggagg aggacattga ccagatcgtg gcagagatca agatgagtct gagcatgacc 720
agcatcacca ggcacagtga ggccagcccc gagcatgggc ctgagccagg gcctgaggac 780
tctgtagagg cctgccacc catcaaggcc agctgcagcc ccagcaggca cgaggcgagg 840
cccaagtcgc tgaacctcct tcccagggcc aagcaccgcc gagaccccca gagaggttc 900
aagcccaaga ccaggacccc agaagagagg ctgaagtggc cccacgagca ggtttgcaat 960
ggtctggagc agccaaggaa gcagcagcgc tctgatctca atggacctgt tgacaataac 1020
aacattccaa aaacaaaaaa ggtggcatca ttccaagtt tgggtgctgt tccagggecc 1080
tgcgaaccaa aaaacctcat cgacgggac atctttgctg ccaattacct ggggtccacc 1140
cagctgctat cagaacggaa ccttccaaa aacatcagaa tgatgcaagc gcaggaggcc 1200
gtcagccggg tcaagaggat gcaaaaggct gctaagatca agaaaaaagc gaattctgag 1260
ggggatgcc agacgtgac ggaagtggac ctcttcattt ccaccagag gatcaaggtt 1320
ttaaatgcag acacgcagga aacctgatg gaccacgct tgcgtaccat ctctacatc 1380
gccgacttg ggaacattgt agtctgatg gccagacgcc gcctgcccc gtcagcctct 1440
caggactgca tcgagaccac gcccggggcc caggaaggca agaagcagta taagatgac 1500
tgccatgtgt tcgagtcgga ggtgcccg ctcatcgccc agtctatcgg ccaggccttc 1560
agcgtggcct accaggagtt cctgcgagcc aatggcatca acccgaaga cttgagccag 1620
aaggaataca gcgacatcat caacaccag gagatgtaca acgacgacct catcacttc 1680
tcaaactcgg agaactgcaa ggagctgcag ctggagaagc acaaggcgca gatcctgggc 1740
gtggtggtgg tggagtcggg ctggggtccc atctgccc cggatgacct ggccaacatg 1800
atgaatggcg gcccgctgc ccgtcgggg aagctgagca tcggggacca gatcatgtcc 1860
atcaatggca ccagcctggt ggggtgccc ctgccacct gccaaaggcat catcaagggc 1920
ctgaagaacc agacacaggt gaagctcaac attgtcagct gtcccccggt caccacggtc 1980
cttatcaagc ggccagacct caagtaccag ctgggttca gcgtgcagaa tgaattatc 2040
tgcagctca tgagggggg cattgtgag cgaggggcg tccgtgtggg ccaccgcatc 2100
atcgagatca acgggcagag cgtgtgtgcc acagcccacg agaagatagt ccaagctctg 2160
tccaactcgg tcggagagat ccacatgaag accatgcccc ccgcatgtt caggctcctc 2220
acgggtcagg agaccccgct gtacatc 2247

```

<210> 7

<211> 695

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

```

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
      5              10              15
Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
      20              25              30
Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
      35              40              45
Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
      50              55              60
Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
      65              70              75              80
Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
      85              90              95
Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
      100             105             110
Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
      115             120             125

```

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130 135 140
 Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145 150 155 160
 Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175
 Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180 185 190
 Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 195 200 205
 Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
 210 215 220
 Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255
 Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270
 Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285
 Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu
 290 295 300
 Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys
 305 310 315 320
 Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg
 325 330 335
 Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp
 340 345 350
 Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu
 355 360 365
 Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala
 370 375 380
 Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn
 385 390 395 400
 Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe
 405 410 415
 Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His
 420 425 430
 Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala
 435 440 445
 Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu
 450 455 460
 Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala
 465 470 475 480
 Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn
 485 490 495
 Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser
 500 505 510
 Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr
 515 520 525

Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln
 530 535 540
 Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn
 545 550 555 560
 Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr
 565 570 575
 Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser
 580 585 590
 Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
 595 600 605
 His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 610 615 620
 Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val
 625 630 635 640
 Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile
 645 650 655
 His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg
 660 665 670
 His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys
 675 680 685
 Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
 690 695

<210> 8

<211> 2085

<212> DNA

<213> Human

<400> 8

atgtctgccg gtttggcact gctcctgctg gccgcctgga cggtcgggc gctggaggta 60
 cccactgatg gtaatgctgg cctgctggct gaacccaga ttgccatgtt ctgtggcaga 120
 ctgaacatgc acatgaatgt ccagaatggg aagtgggatt cagatccatc agggacaaa 180
 acctgcattg ataccaagga aggcacctc cagtattgcc aagaagtcta ccctgaactg 240
 cagatcacca atgtgtaga agccaacaa ccagtgaacca tcagaactg gtgcaagcgg 300
 ggccgcaagc agtgaagac ccatccccc tttgtgatt cctaccgctg cttagttagt 360
 gagttttaa gtgatgccct tctcgttct gacaagtga aattcttaca ccaggagagg 420
 atggatgttt gcgaaactca tcttcactgg cacaccgtc ccaaagagac atgcagtga 480
 aagagtacca acttgcata ctacggcatg ttgctgccct gcggaattga caagttccga 540
 gggtagagt ttgtgtgtg cccactggct gaagaaagt acaatgtgga ttctgtgat 600
 gcggaggagg atgactcgga tgtctgttg gccggagcag acacagacta tgcagatgg 660
 agtgaagaca aagtagtaga agtagcagag gaggaagaag tggctgaggt ggaagaaga 720
 gaagccgatg atgacgagga cgatgaggat ggtgatgagg tagaggaaga ggctgaggaa 780
 ccctacgaag aagccacaga gagaaccacc agcattgcca ccaccaccac caccaccaca 840
 gagtctgtgg aagagtggt tcgagttcct acaacagcag ccagtacccc tgatgccgtt 900
 gacaagtatc tcgagacacc tgggatgag aatgaacatg ccattttcca gaaagccaaa 960
 gagaggcttg agccaagca ccgagagaga atgtcccagg tcatgagaga atgggaagag 1020
 gcagaacgtc aagcaagaa cttgcctaaa gctgataaga aggcagttat ccagcatttc 1080
 caggagaaag tggatcttt ggaacaggaa gcagccaacg agagacagca gctggtggag 1140
 acacacatgg ccagagtga agccatgctc aatgaccgcc gccgcctggc cctggagaac 1200
 tacataccg ctctgcaggc tgttctcct cgccctcgtc acgtgttcaa tatgctaaag 1260
 aagtatgtcc gcgcagaaca gaaggacaga cagcacacc taaagcattt cgagcatgtg 1320
 cgcagtgtgg atcccaagaa agccgtcag atccgtccc aggttatgac acacctcgt 1380

gtgatttatg agcgcataaa tcagtctctc tccctgctct acaacgtgcc tgcagtggcc 1440
 gaggagattc aggatgaagt tgatgagctg cttcagaaag agcaaaacta ttcagatgac 1500
 gtcttgccca acatgattag tgaaccaagg atcagttacg gaaacgatgc tctcatgcca 1560
 tctttgaccg aaacgaaaac caccgtggag ctcttcccga tgaatggaga gttcagcctg 1620
 gacgatctcc agccgtggca tttctttggg gctgactctg tgccagccaa cacagaaaac 1680
 gaagttgagc ctgttgatgc ccgcctgct gccgaccgag gactgaccac tcgaccaggt 1740
 tctgggttga caaatatcaa gacggaggag atctctgaag tgaagatgga tgcagaattc 1800
 cgacatgact caggatatga agttcatcat caaaaattgg tgttctttgc agaagatgtg 1860
 ggttcaaaca aaggtgcaat cattggactc atggtggcgc gtgttgatcat agcgacagtg 1920
 atcgatcatc ccttggtgat gctgaagaag aaacagtaca catccattca tcatggtgtg 1980
 gtggaggttg acgcccgtgt caccagag gagcgccacc tgtccaagat gcagcagaac 2040
 ggctacgaaa atccaaccta caagttcttt gacgatgc agaac 2085

<210> 9

<211> 273

<212> PRT

<213> Human

<400> 9

Met Asp Ala Thr Lys Leu Glu Tyr Glu Arg Ala Ser Lys Val Asp Gln
 5 10 15
 Phe Val Thr Arg Phe Leu Leu Arg Glu Thr Val Ser Gln Leu Gln Ala
 20 25 30
 Leu Gln Ser Ser Leu Glu Gly Ala Ser Asp Thr Leu Glu Ala Gln Ala
 35 40 45
 His Gly Trp Arg Ser Asp Ala Glu Ser Val Glu Ala Gln Ser Arg Leu
 50 55 60
 Cys Gly Ser Arg Arg Ala Gly Arg Arg Ala Leu Arg Ser Val Ser Arg
 65 70 75 80
 Ser Ser Thr Trp Ser Pro Gly Ser Ser Asp Thr Gly Arg Ser Ser Glu
 85 90 95
 Ala Glu Met Gln Trp Arg Leu Gln Val Asn Arg Leu Gln Glu Leu Ile
 100 105 110
 Asp Gln Leu Glu Cys Lys Val Arg Ala Val Gly Pro Gly Pro His Lys
 115 120 125
 Gly Gly Pro Ser Trp Tyr Pro Pro Glu Pro Gly Pro Cys Trp Arg Pro
 130 135 140
 Gly Pro His Ser Val Pro Ser Gln Ala Pro Arg Leu Glu Pro Leu Arg
 145 150 155 160
 Glu Glu Asp Leu Ala Lys Gly Pro Asp Leu His Ile Leu Met Ala Gln
 165 170 175
 Arg Gln Val Gln Val Ala Glu Glu Gly Leu Gln Asp Phe His Arg Ala
 180 185 190
 Leu Arg Cys Tyr Val Asp Phe Thr Gly Ala Gln Ser His Cys Leu His
 195 200 205
 Val Ser Ala Gln Lys Met Leu Asp Gly Ala Ser Phe Thr Leu Tyr Glu
 210 215 220
 Phe Trp Gln Asp Glu Ala Ser Trp Arg Arg His Gln Gln Ser Pro Gly
 225 230 235 240
 Ser Lys Ala Phe Gln Arg Ile Leu Ile Asp His Leu Arg Ala Pro Asp
 245 250 255
 Thr Leu Thr Thr Val Phe Phe Pro Ala Ser Trp Trp Ile Met Asn Asn

260 265 270

Asn
 <210> 10
 <211> 819
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 10

atggatgcca ccaagctgga gtacgagagg gcctccaaag tggaccagtt tgtgacgcgc 60
 ttctgctgc gggagacggt gagccagctg caagcccttc agagctcgt ggaggggagc 120
 tcagataccc tggaggccca ggcccatggc tggcggtcag atgcagagag cgtggaggcg 180
 cagagcaggc tctcgggcag ccggcgggca ggacgccgag ccctgaggag tgtcagccgg 240
 tcatccacct ggtcccccg cttcttgac acaggcgca gtcagaagc cgaaatgcag 300
 tggcggtcc aggtgaaccg cctccaggag ctcatcgacc agctcagtg caaggtgagg 360
 gccgtgggc caggsgcca caaggagga ccctcctgt atccaccaga gccaggccca 420
 tgctggagc ccggcccaca ctctgtgcc tcacaggccc ccggctgga acccctgct 480
 gaagaggacc tggccaagg gcctgacttg cacatcctca tggccagag gcaggtccag 540
 gtggcagagg aaggcctgca ggacttcac cgagccctgc gctgctatgt ggacttcaca 600
 ggggccaga gccattgct gcatgtgtcc gccagaaga tgctggacgg tgcctcctc 660
 accctgatg agttctgca ggatgaggcc tcttgagaa ggcaccagca gtcgctggc 720
 agcaaggcct tccagcgcat cctcatcgac cactgcggg ccccgacac cctcaccat 780
 gtgtcttcc cagcctctg gtggataatg aataacaac 819

<210> 11
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 11

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

<210> 12
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 12

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

<210> 13
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 13

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
 35 40

【図面の簡単な説明】

【図1】XB31ファミリー蛋白質の構造の概要図を示す。

【図2】XB31 α 1とXB31 β のノーザンブロット解析の結果を示す。probeは使用したプローブを示す。XB31 α はXB31 α 1を示す。 β -actinは β -アクチンを示す。Heartは心臓、Brainは脳、Placentaは胎盤、Lungは肺、Liverは肝臓、Skeletal muscleは平滑筋、Kindneyは腎臓、Pancreasは膵臓を示す。数値はmRNAの大きさ(kb)を示す。

【図3】XB31 α 1とXB31 β のウエスタンブロット解析の結果を示す。blot UT83はXB31 α 1ポリクローナル抗体UT83を、blot BS7はXB31 β ポリクローナル抗体BS7を用いた時の結果を示す。数値は分子量(kDa)を示す。バンドはXB31 α 1およびXB31 β の検出位置を示す。

【図4】XB31 α 1のウエスタンブロット解析の結果を示す。blot UT83はXB31 α 1ポリクローナル抗体UT83を示す。-は抗原ペプチドが存在しない場合、Hは抗原ペプチド(40nM)が存在する場合を示す。数値は分子量を示す。バンドはXB31 α 1の検出位置を示す。

【図5】マウスの各組織におけるXB31 α 1およびXB31 β の発現をウエスタンブロット解析した結果を示す。Blot anti-XB31 α は抗XB31 α 1抗体をブロットした場合を示す。Blot anti-X11Lは抗X11L抗体をブロットした場合を示す。Brは脳、Htは心臓、Luは肺、Liは肝臓、Kidは腎臓、Musは筋肉を示す。バンドはそれぞれXB31 α およびXB31 β の存在を示す。XB31 α はXB31 α 1を示す。

【図6】マウス脳の各部分におけるXB31 α 1およびXB31 β の発現をウエスタンブロット解析した結果を示す。Blot anti-XB31 α は抗XB31 α 1抗体をブロットした場合を示す。Blot anti-X11Lは抗X11L抗体をブロットした場合を示す。OBは嗅球、CCは大脳皮質、STは線条体、Hipは海馬、Ceは小脳、Midは中脳、Thは視床、Ponsは橋、Sciは坐骨神経を示す。バンドはそれぞれXB31 α およびXB31 β の存在を示す。XB31 α はXB31 α 1を示す。

【図7】XB31 α 1とX11Lとの共役免疫沈降を行った結果を示す。+はXB31 α またはX11Lを発現させた場合、-は発現させていない場合を示す。XB31 α はXB31 α 1を示す。anti-XB31 α は抗

体XB31 α 1抗体を示す。anti-X11Lは抗体X11L抗体を示す。control IgGは非免疫動物由来のコントロール用免疫グロブリンを示す。LystelはCOS細胞の可溶化物を示す。バンドはそれぞれXB31 α 1およびX11Lの存在を示す。

【図8】XB31 β とX11Lとの共役免疫沈降を行った結果を示す。+はXB31 β またはX11Lを発現させた場合、-は発現させていない場合を示す。anti-XB31 β は抗XB31 β 抗体を示す。anti-X11Lは抗体X11L抗体を示す。control IgGは非免疫動物由来のコントロール用免疫グロブリンを示す。LystelはCOS細胞の可溶化物を示す。バンドはそれぞれXB31 β およびX11Lの存在を示す。

【図9】XB31 α 1とX11Lの結合におけるX11L結合ドメインを同定した結果を示す。crudeはhX11L由来蛋白質構成物を発現しているCOS細胞の全細胞可溶化物を示す。XB31 α はGST-XB31 α 細胞質ドメイン融合蛋白質を結合しているグルタチオンビーズを用いた場合の結果を示す。GSTはGST蛋白質のみを結合しているグルタチオンビーズを用いた場合の結果を示す。XB31 α はXB31 α 1を示す。X11Lは全長X11Lを示す。NはhX11Lのアミノ末端ドメインを示す。N+PIはhX11LのPIドメインを結合したhX11Lのアミノ末端ドメインを示す。数値は標準蛋白質の分子量(kDa)を示す。

【図10】XB31 β とX11Lの結合におけるX11L結合ドメインを同定した結果を示す。crudeはhX11L由来蛋白質構成物を発現しているCOS細胞の全細胞可溶化物を示す。XB31 β はGST-XB31 β 細胞質ドメイン融合蛋白質を結合しているグルタチオンビーズを用いた場合の結果を示す。GSTはGST蛋白質のみを結合しているグルタチオンビーズを用いた場合の結果を示す。X11Lは全長X11Lを示す。NはhX11Lのアミノ末端ドメインを示す。N+PIはhX11LのPIドメインを結合したhX11Lのアミノ末端ドメインを示す。数値は標準蛋白質の分子量(kDa)を示す。

【図11】X11L(全長X11L)、N+PI(hX11LのPIドメインを結合したhX11Lのアミノ末端ドメイン)およびN(hX11Lのアミノ末端ドメイン)の構造を示す。

【図12】XB31 α とX11Lのマウス大脳皮質ニューロンにおける局在性およびそれをMerge画像で現した結果を示す。

【図13】XB31 α とX11Lのマウス脳の各組織における局在性およびそれをMerge画像で現した結果を示す。Hippocampus CA3は海馬CA3領域、Cerebral Cortexは大脳皮質、Cerebellar Cortexは小脳を示す。

【図14】XB31 α 1またはXB31 β と β APPおよびX11Lとの結合をHEK293細胞を用いて調べた結果を示す。AはG369(抗 β APP抗体)を、Bは22C11(β APPの細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体)を用いてウエスタンブロット解析した結果を示す。APPは β APPを、XB α 1はXB α 1を、FLAG XB31 β はFLAGとXB31 β の融合蛋白質を示す。+は各蛋白質の発現プラスミドをHEK293細胞に導入した場合を示す。-はpcDNA3ベクターを導入した場合を示す。blot anti-APPはG369(抗 β APPポリクローナル抗体)を、blot anti-X11LはUT29(抗X11Lポリクローナル抗体[Journal of Biological Chemistry 274, 2243-2254, 1999])を、blot anti-XB31 α はUT83(抗XB31 α ポリクローナル抗体)を、blot anti-FLAGは抗FLAG抗体を用いてウエスタンブロット解析した結果を示す。

【図15】HEK293細胞を用いて β APPの細胞内代謝におけるXB31 α 1およびX11Lの影響を調べた結果を示す。Chase[h]は細胞をパルス標識後の測定時間を示す。APP/Vector/Vectorは β APP発現プラスミドのみを、APP/hX11L/Vectorは β APP発現プラスミドおよびhX11L発現プラスミドを、APP/hX11L/XB31 α 1は β APP発現プラスミド、hX11L発現プラスミドおよびXB31 α 1発現プラスミドを、APP/Vector/XB31 α 1は β APP発現プラスミドおよびXB31 α 1発現プラスミドをHEK293細胞に導入した場合の結果を示す。mAPPは成熟 β APPの存在を、imAPPは前駆体 β APPの存在を示す。

【図16】図15の定量結果において、時間0のimA

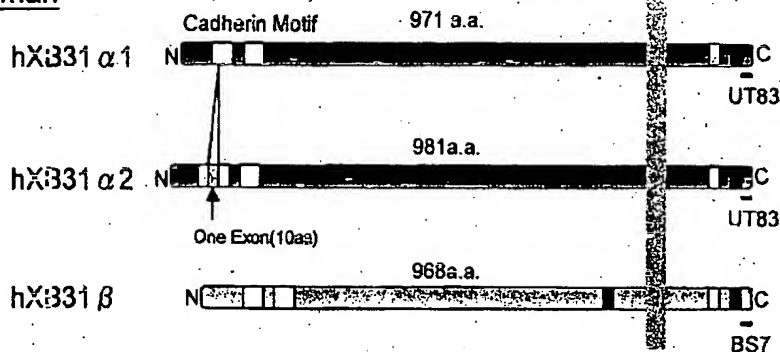
PPのシグナル強度を1とした相対強度をグラフ上にプロットした図である。横軸は測定時間、縦軸はimAPPの相対強度を示す。APP/Vector/Vectorは β APP発現プラスミドのみを、APP/hX11L/Vectorは β APP発現プラスミドおよびhX11L発現プラスミドを、APP/hX11L/XB31 α 1は β APP発現プラスミド、hX11L発現プラスミドおよびXB31 α 1発現プラスミドを、APP/Vector/XB31 α 1は β APP発現プラスミドおよびXB31 α 1発現プラスミドをHEK293細胞に導入した場合の結果を示す。

【図17】APP、hX11L、XB31 α 1を共発現させた場合のA β 40およびA β 42の生産量を調べた結果を示す。縦軸はA β 40またはA β 42の生産量(pM)を示す。横軸のAPPは β APP発現プラスミドのみを、APP/hX11Lは β APP発現プラスミドおよびhX11L発現プラスミドを、APP/hX11L/XB31 α 1は β APP発現プラスミド、hX11L発現プラスミドおよびXB31 α 1発現プラスミドを、APP/XB31 α 1は β APP発現プラスミドおよびXB31 α 1発現プラスミドをHEK293細胞に導入した場合を示す。

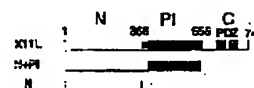
【図18】hX11LとXB31 α の相互作用によるA β 産生機構の概略図を示す。NPTYおよびNPはそれぞれX11LのPIDメインとの結合部位を示す。Suppressionは抑制していること no suppressionは抑制していないこと Generation of A β は、A β 40が産生すること Enhanceは強化すること Interactionは結合すること Stronger Suppressionは強い抑制、Stabilization of APP metabolismはAPPの代謝安定化を示す。

【図1】

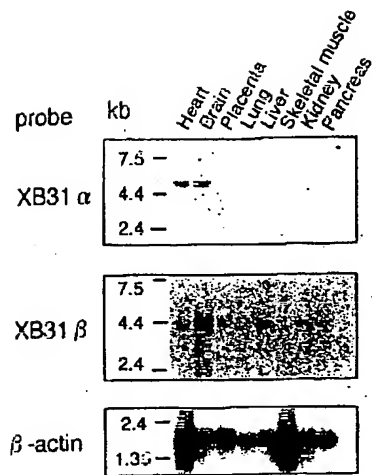
Human



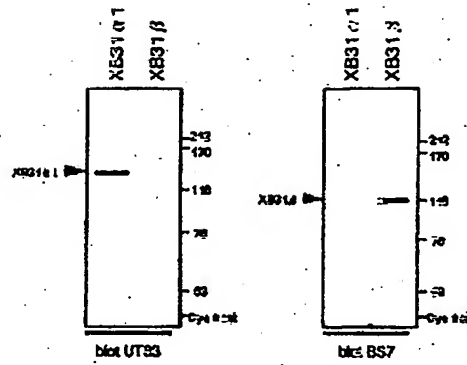
【図11】



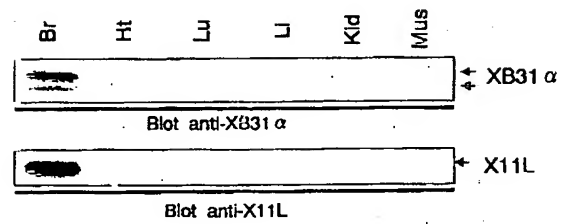
【図2】



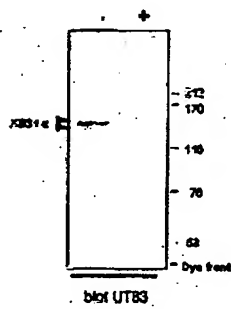
【図3】



【図5】



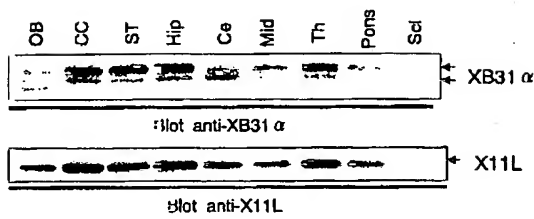
【図4】



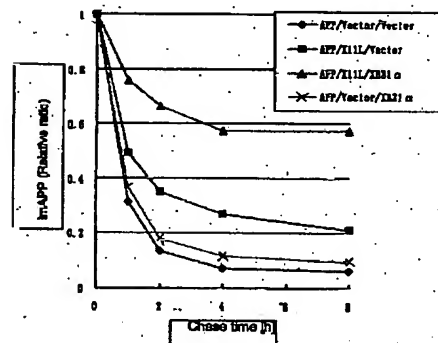
【図9】



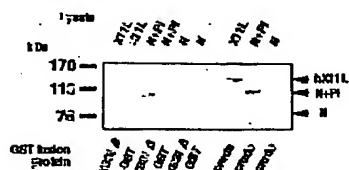
【図6】

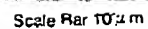
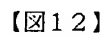


【図16】

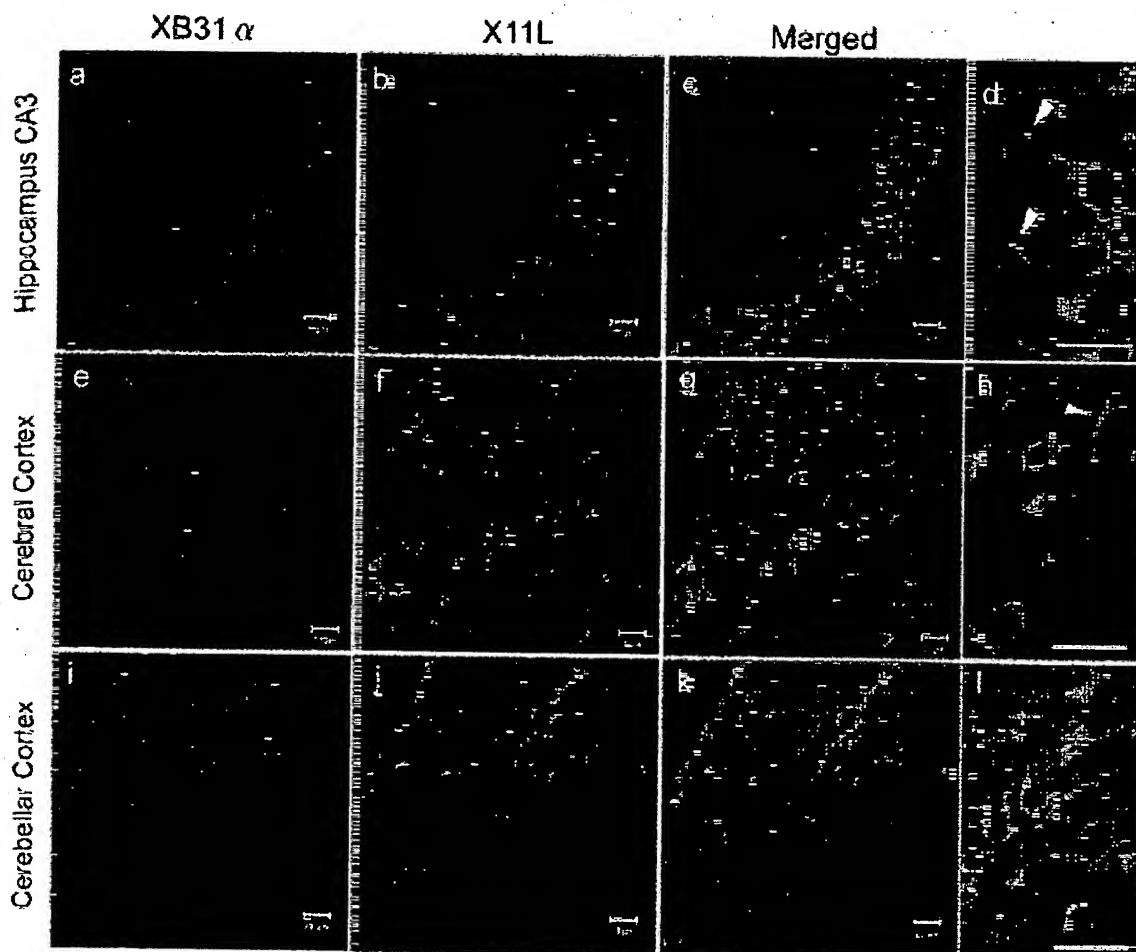


【図10】

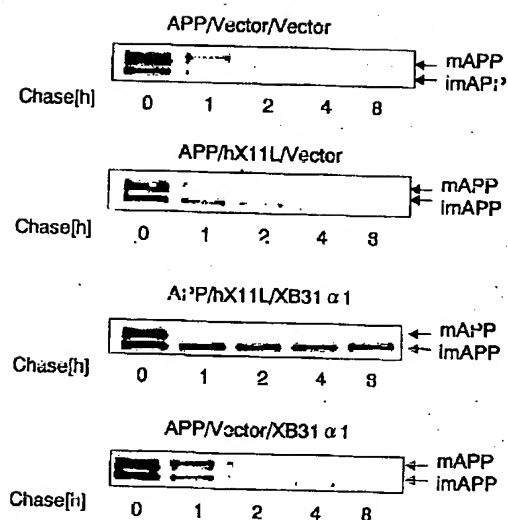




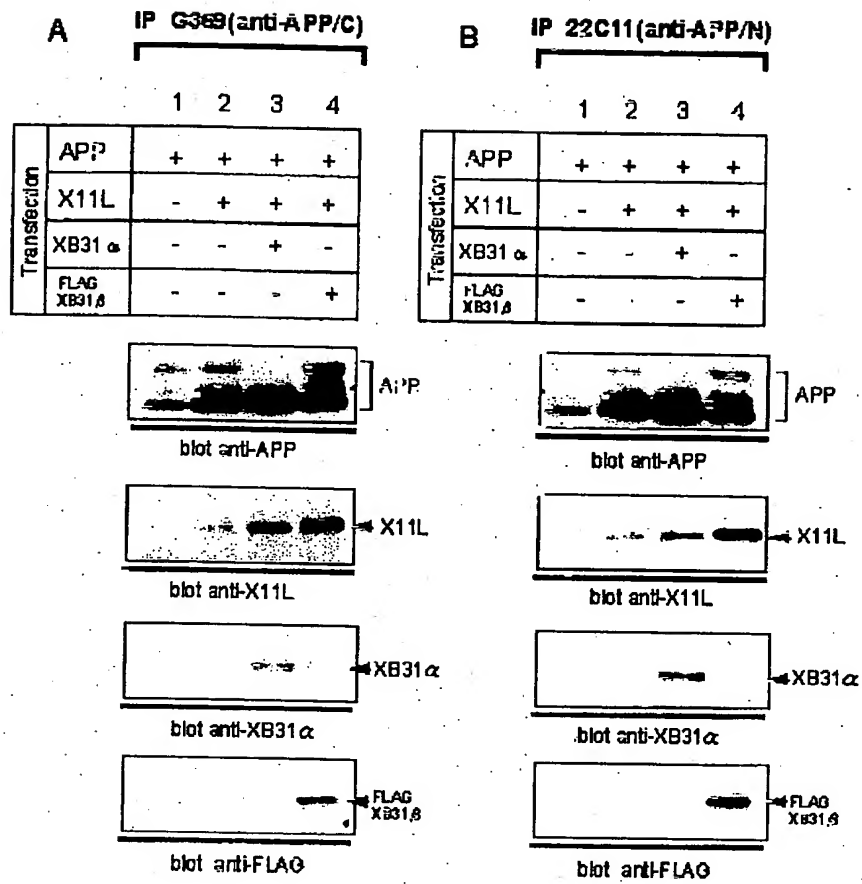
【図13】



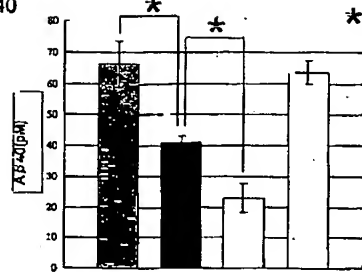
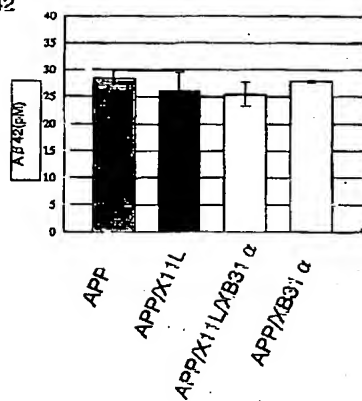
【図15】



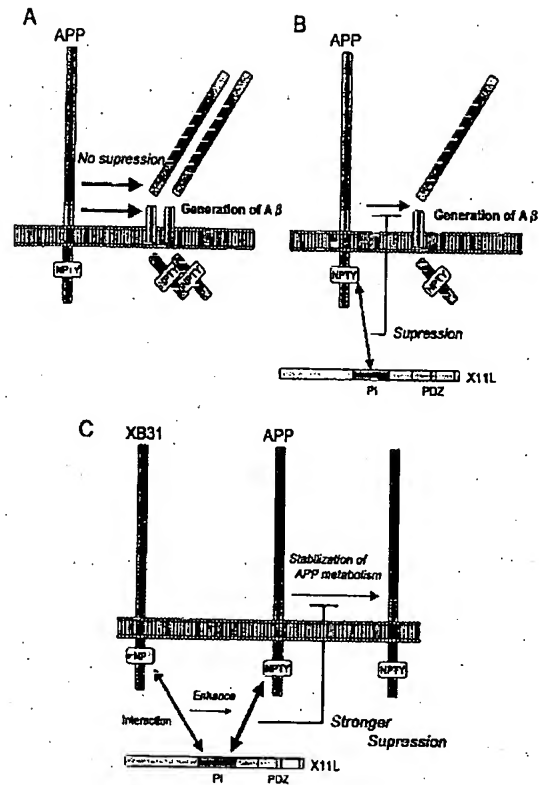
【図14】



【図17】

(A) A β 40(B) A β 42

【図18】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

C 07 K 19/00

C 12 Q 1/02

G 01 N 33/15

33/50

// C 12 N 15/09

Z N A

F I

C 07 K 19/00

C 12 Q 1/02

G 01 N 33/15

33/50

C 12 N 15/00

Z N A

Z

Z

A

(参考)

(72) 発明者 鈴木 利治

北海道札幌市北区北8条西7丁目中央第一
公務員宿舎14-22

(72) 発明者 荒木 陽一

北海道札幌市北区北10条西2丁目17-1
コンフォール三貴905

(72) 発明者 富田 進

神奈川県横浜市青葉区もみの木台29-10

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 BB01 BB07

BB14 BB41 BB48 BB50 BB51

CB01 CB17 DA13 DA36 FA16

FB02 FB03 FB08

4B024 AA01 BA80 CA04 HA11 HA17

4B063 QA18 QQ05 QQ79 QR48 QR74

QS33

4C084 AA16 MA17 MA23 MA35 MA37

MA38 MA52 MA66 NA14 ZA152

ZA162 ZC412

4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA45

EA21 EA50 FA74